

**Isolierung und Strukturaufklärung von chemotaxonomisch
relevanten Sekundärmetaboliten aus höheren Pilzen,
insbesondere aus der Ordnung der *Boletales***



Gertraud Gruber

aus

München

2002

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Isolierung und Strukturaufklärung von chemotaxonomisch
relevanten Sekundärmetaboliten aus höheren Pilzen,
insbesondere aus der Ordnung der *Boletales***

Gertraud Gruber

aus
München

2002

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Wolfgang Steglich betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 18.11.2002

Dissertation eingereicht am 18.11.2002

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Steglich

2. Gutachter: Prof. Dr. Th. Lindel

Mündliche Prüfung am 18.12.2002

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Steglich am Institut für Organische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München in der Zeit von September 1998 bis Februar 2002 durchgeführt.

Danksagung:

Meinem verehrten Lehrer

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Steglich

danke ich, daß er mir als Lebensmittelchemikerin die Möglichkeit gegeben hat, in seinem Arbeitskreis zu promovieren. Auch für seine stets wohlwollende Förderung dieser Arbeit und viele wertvolle Ratschläge möchte ich mich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Th. Lindel danke ich herzlich für die Übernahme des Koreferats.

Meinen Laborkollegen Dr. K. Aulinger, Dr. C. Haug, Dr. S. Kroiß, Dr. M. Lang, Dr. P. Spiteller und S. Voß möchte ich für die herzliche Aufnahme in den Arbeitskreis danken, für die große Hilfsbereitschaft und viele wertvolle Tips.

Auch Dr. N. Arnold und Dr. L. Kerschensteiner danke ich für die schöne gemeinsame Laborzeit und für die vielen anregenden Diskussionen.

Mein Dank gilt auch allen übrigen Arbeitskreiskollegen für das angenehme Arbeitsklima, im besonderen A. Bartsch, Dr. H. Ebel, N. Ermel, Dr. N. Feling, Dr. R. Feling, C. Gräf, Dr. M. Heidl, M. Heinrich, K. Hohnholt, T. Hübscher, Dr. B. Irlinger, A. Kreipl, Dr. C. Miksch, Dr. C. Peschko, Dr. M. Rüth, Dr. B. Sonntag, Dr. C. Stark, Dr. C. Winklhofer, M. Winner und Dr. K. Zeitler.

Ebenso bedanke ich mich bei Dr. N. Arnold für die zahlreichen Pilze und für viele gute Ratschläge und Anregungen bei der kritischen Durchsicht meines Manuskriptes.

Ganz besonders möchte ich mich bei A. Bartsch bedanken für die vielen Hilfestellungen und die sorgfältige Korrektur meiner Arbeit, für die gute Verpflegung in so mancher Mittagspause und die aufmunternden Ausflüge zu OBI.

Dr. P. Spiteller danke ich nicht nur für zahlreiche Messungen, sondern auch für viele anregende chemische Diskussionen, für die Durchsicht meines Manuskriptes und die stets gefüllten Süßigkeitsvorräte.

Auch Prof. Dr. M. Spiteller gilt mein Dank für die Durchführung spezieller MS-Messungen.

Dr. M. Martín und Dr. P. Daniels, Réal Jardino Botanico, Madrid, danke ich für die Zusammenarbeit und die Zusendung von Pilzkollektionen.

Bei den Mitarbeitern der Analytik-Abteilung, insbesondere Dipl. Inf. C. Dubler, Dr. W. Spahl, R. Seidl, H. Huber, Dr. D. Stephenson und I. Brück bedanke ich mich für die Durchführung zahlloser Messungen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Schwiegereltern für die Unterstützung während meiner Promotionszeit, besonders für die technischen Laborhilfen und die Begleitung beim Pilzesammeln.

Ganz herzlichst bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern für die Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung, für ihre Begeisterung an meiner Arbeit und für das Interesse an der Natur, welches mir meine Pilzausflüge interessanter und schöner gemacht hat.

Der größte Dank gilt natürlich meinem Mann J. Gruber, für seine Geduld und die vielen Stunden, die er mit dem Installieren von Programmen verbracht hat, um dann lange Abende alleine zu verbringen. Ohne seine liebevolle Unterstützung und Aufmunterung wären mein Studium und meine Promotion nicht möglich gewesen.

Für meinen Mann Jürgen

ΜΥΚΑΣ ΘΕΟΡΥΜΕΝΟΥ ΦΑΓΟΜΕΝΟΥ

Giovanni Antonio Battarra (1755)

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1 Einleitung	6
2 Allgemeiner Teil	7
2.1 Zur Geschichte der Mykologie	7
2.2 Einordnung der Pilze	8
2.3 Charakteristische Sekundärmetabolite der <i>Boletales</i>	9
2.3.1 Grevilline	10
2.3.2 Terphenylchinone	11
2.3.3 Hydroxypulvinsäuren	12
2.3.4 Ungewöhnliche Pulvinsäurederivate	14
2.3.5 Dimere Pulvinsäurederivate	15
2.3.6 Diarylcyclopentenone	17
2.4 Biosynthese der vom Atromentin abgeleiteten Inhaltsstoffe	18
2.5 Sekundärmetabolite aus anderen Biosynthesewegen	21
2.5.1 Prenylierte 1,4-Benzochinone	21
2.5.2 Calopine	22
2.5.3 Retipolide	22
2.5.4 Melanocrocine und Boletocrocine	23
2.5.5 Chalciporon	25
3 Spezieller Teil	26
3.1 Der Porphyrröhrling (<i>Porphyrellus pseudoscaber</i> (Secr.) Singer)	26
3.1.1 Der Pilz	26
3.1.2 Bisherige Erkenntnisse	27
3.1.3 Isolierung und Untersuchung der Inhaltsstoffe	27

3.1.4	Strukturaufklärung	30
3.1.5	Beurteilung des Ergebnisses	31
3.1.6	Weitere Farbstoffisolierungen	32
3.1.7	Untersuchung von amerikanischem Material	33
3.1.8	Probleme bei der Isolierung und Strukturaufklärung	33
3.1.9	Chemotaxonomische Beurteilung	34
3.2	<i>Xanthoconium affine</i> (Peck) Singer	35
3.2.1	Pilzbeschreibung	35
3.2.2	Bisherige Arbeiten	36
3.2.3	Isolierung der Farbstoffe	36
3.2.4	Strukturaufklärung von xar1	37
3.2.5	Struktur von xag1	38
3.2.6	Identifizierung von xag3	39
3.2.7	Chemotaxonomische Interpretation der Ergebnisse	39
3.2.8	Zur Problematik der Badionderivate	39
3.3	<i>Boletus erythropus</i> (Fr.) Pers.	40
3.3.1	Beschreibung des Pilzes	40
3.3.2	Bisherige Erkenntnisse und Zielsetzung dieser Arbeit	40
3.3.3	Isolierung der Verbindungen aus der Huthaut	41
3.3.4	Ein neues Badionderivat beb1	42
3.3.5	Vergleich mit ähnlichen Strukturen	46
3.3.6	Ein neues Badionderivat beb3	46
3.3.7	Ausblick	49
3.4	<i>Leccinum chromapes</i> (Frost) Singer	50
3.4.1	Der Pilz	50
3.4.2	Bisheriger Kenntnisstand	51
3.4.3	Isolierung des Hutfarbstoffes	51
3.4.4	Identifizierung von bc1	53

3.4.5 Beurteilung des Ergebnisses	54
3.4.6 Ein neuer Pilzinhaltsstoff	54
3.4.7 Möglicher Biosyntheseweg der Chromapedsäure (77)	57
3.4.8 Verbindungen mit ähnlicher Struktur	58
3.4.9 Ein Oxidationsprodukt der Chromapedsäure (77)	59
3.5 <i>Boletus griseus</i> Frost	61
3.5.1 Der Pilz	61
3.5.2 Bisherige Arbeiten	62
3.5.3 Aufarbeitung	62
3.5.4 Ein neues Pulvinsäurederivat bgr1	63
3.5.5 Ein Pulvinsäurederivat bgr 2	66
3.5.6 Acetylierung von 86 und 88	68
3.5.7 Chemotaxonomische Betrachtung	68
3.6 <i>Boletus retipes</i> Berk. & Curt.	69
3.6.1 Pilzbeschreibung	69
3.6.2 Bisherige Arbeiten	70
3.6.3 Ziel dieser Arbeit	72
3.6.4 Isolierung der Inhaltsstoffe	72
3.6.5 Probleme bei der Isolierung	73
3.6.6 Strukturaufklärung	74
3.6.7 Biosynthese von Isoretipolid A (94)	80
3.6.8 Isoretipolid A-Methoxyfulven	81
3.6.9 Versuche zur Isolierung von Ornatipolid	81
3.7 <i>Boletus longicurvipes</i> Snell & Smith	83
3.7.1 Pilzbeschreibung	83
3.7.2 Zielsetzung dieser Arbeit	83
3.7.3 Extraktion des Stiefarbstoffes	84
3.7.4 Strukturaufklärung	86

3.7.5 Versuche zur Isolierung der zweiten Verbindung	87
3.7.6 Untersuchungen zu weiteren Cyclopentenonderivaten	88
3.7.7 Diskussion des Ergebnisses	89
3.8 Brasilianische Röhrlinge	90
3.8.1 <i>Boletinellus rompelii</i> (Pat. & Rick) Watling	90
3.8.2 <i>Boletinellus exiguus</i> (Singer & Digilio) Watling	90
3.8.3 Bisherige Arbeiten und Ziel dieser Untersuchung	91
3.8.4 Aufarbeitung der Fruchtkörper	91
3.8.5 Farbstoffe aus <i>Boletinellus rompelii</i>	92
3.8.6 Farbstoffe aus <i>Boletinellus exiguus</i>	92
3.8.7 Auswertung der HPLC-Untersuchung	92
3.9 <i>Calostoma cinnabarinum</i> Corda	93
3.9.1 Beschreibung des Pilzes	93
3.9.2 Bisherige Erkenntnisse	93
3.9.3 Isolierung des Farbstoffes	94
3.9.4 Strukturaufklärung	95
3.9.5 Silylierung von cc9	96
3.9.6 Methylierung von cc9	98
3.9.7 Bekannte Verbindungen ähnlicher Struktur	99
3.9.8 Chemotaxonomische Betrachtung	100
3.10 Vergleich der molekularbiologischen Daten mit den Ergebnissen der pigmentchemischen Untersuchung	102
3.10.1 Einordnung anhand sequenzanalytischer Untersuchungen	102
3.10.2 Einordnung anhand gemeinsamer Sekundärmetabolite	105
3.11 <i>Clavulinopsis fusiformis</i> (Fr.) Corner	108
3.11.1 Der Pilz	108
3.11.2 Bisherige Erkenntnisse und Aufgabe dieser Arbeit	108
3.11.3 Isolierung der Farbstoffe	110

3.11.4 Ergebnisse	111
3.12 <i>Pycnoporellus fulgens</i> (Fr.) Donk	113
3.12.1 Pilzbeschreibung	113
3.12.2 Bisherige Erkenntnisse	113
3.12.3 Isolierung der Inhaltsstoffe	114
3.12.4 Strukturaufklärung	115
3.12.5 Silylierung von 110	117
3.12.6 Weitere Überlegungen	118
3.12.7 Verbindungen mit ähnlicher Struktur	119
4 Experimenteller Teil	120
4.1 Geräte und Materialien	120
4.1.1 Physikalische Daten	120
4.1.2 NMR-Spektroskopie	121
4.1.3 Massenspektrometrie	121
4.1.4 Chromatographie	122
4.2 <i>Porphyrellus pseudoscaber</i>	126
4.2.1 Aufarbeitung	126
4.2.2 Bisnorbadiochinon A (31)	127
4.2.3 Norbadion A (30)	128
4.2.4 Bisnorbadiochinon A (31)	129
4.2.5 Badion A (29)	130
4.3 <i>Xanthoconium affine</i>	131
4.3.1 Isolierung der Farbstoffe	131
4.3.2 Atromentinsäure (14)	131
4.3.3 Bisnorbadiochinon A (31)	132
4.3.4 Norbadion A (30)	133
4.4 <i>Boletus erythropus</i>	134

4.4.1 Aufarbeitung der Pilzhäute	134
4.4.2 Farbstoff beb1	134
4.4.3 Badion B (32)	135
4.4.4 Verbindung beb3	136
4.5 <i>Leccinum chromapes</i>	137
4.5.1 Isolierung	137
4.5.2 Hutfarbstoff Variegatorubin (18)	137
4.5.3 Chromapedsäure (77)	138
4.5.4 Oxidationsprodukt 84	139
4.6 <i>Boletus griseus</i>	140
4.6.1 Extraktion der Farbstoffe	140
4.6.2 Pulvinsäurederivat 86	140
4.6.3 Pulvinsäurederivat 88	141
4.6.4 Acetylierung	142
4.6.5 Acetylierungsprodukt 89	142
4.7 <i>Boletus retipes/ornatipes</i>	143
4.7.1 Isolierung der Inhaltsstoffe	143
4.7.2 Isoretipolid A (94)	143
4.7.3 Retipolid A (57)	144
4.7.4 Derivatisierung zum Isoretipolid A-Methoxyfulven	145
4.7.5 Isoretipolid A-Methoxyfulven (96)	145
4.8 <i>Boletus longicurvipes</i>	146
4.8.1 Extraktion der Pilzstiele	146
4.8.2 Gyroporin (39)	147
4.9 <i>Boletinellus rompelii</i> und <i>Boletinellus exiguus</i>	148
4.9.1 Isolierung	148
4.9.2 Variegatsäure (17) aus <i>Bol. rompelii</i> bzw. <i>Bol. exiguus</i>	148
4.10 <i>Calostoma cinnabarinum</i>	149

4.10.1 Aufarbeitung der Pilze	149
4.10.2 Farbstoff 100	149
4.10.3 Silylierung	150
4.10.4 Silylierungsprodukt 99	150
4.10.5 Methylierung von cc9	151
4.10.6 Methylester 101	151
4.11 <i>Clavulinopsis fusiformis</i>	152
4.11.1 Extraktion der deutschen und amerikanischen Kollektion	152
4.11.2 Fusiformin A (102)	153
4.11.3 Fusiformin B (103)	153
4.11.4 Fusiformin A-3-sulfat (104)	154
4.11.5 Fusiformin B-3-sulfat (105)	154
4.11.6 (13Z)-Fusiformin B (107)	155
4.11.7 (9Z)-Fusiformin B-3-sulfat (106)	155
4.11.8 (Z)-Fusiformin A (109)	156
4.12 <i>Pycnoporellus fulgens</i>	157
4.12.1 Isolierung von py1	157
4.12.2 Agaricinsäure (110)	157
4.12.3 Silylierung	158
4.12.4 Silylierungsprodukt 111	158
5 Anhang	159
5.1 Verzeichnis der Pilzkollektionen	159
5.2 Abkürzungsverzeichnis	161
6 Literaturverzeichnis	163

Zusammenfassung

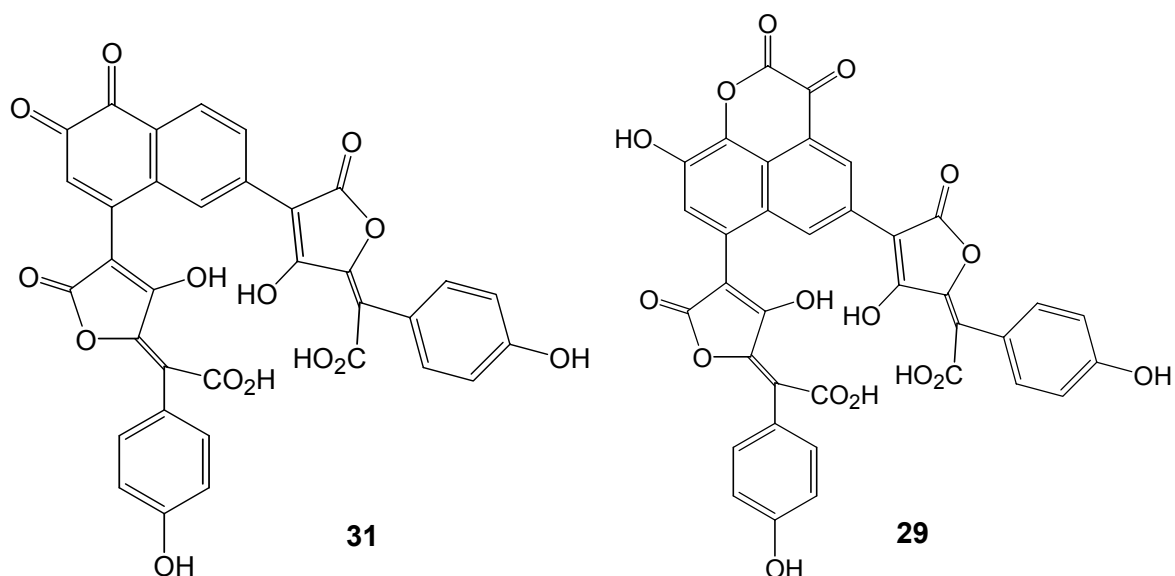
Diese Arbeit befaßt sich mit der Isolierung und Charakterisierung von Sekundärmetaboliten aus Pilzen, insbesondere aus Arten der Ordnung *Boletales*, deren systematische Einordnung bislang umstritten war.

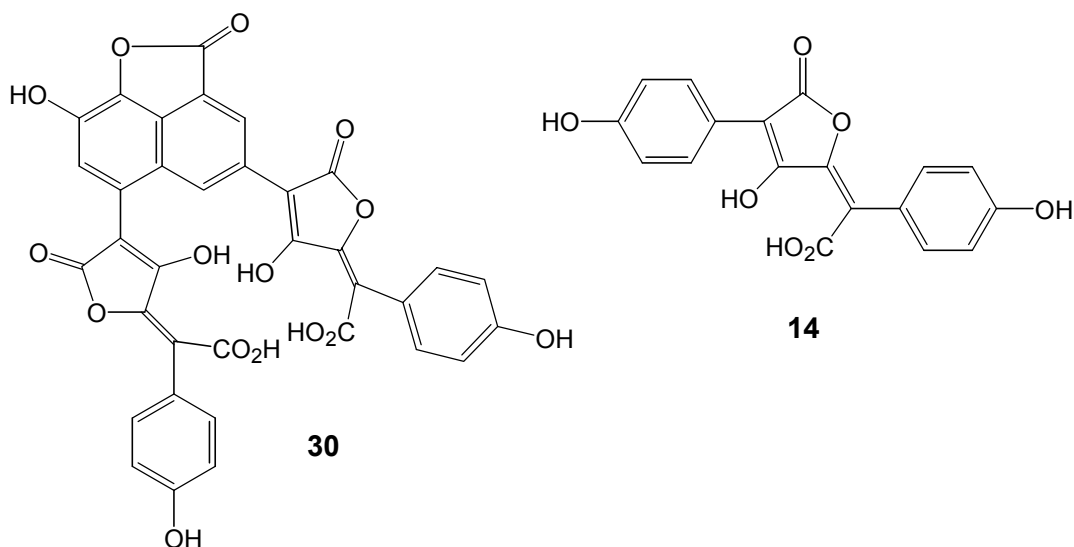
Die Isolierung der Pilzinhaltsstoffe erfolgte vor allem mittels Normaldruck- und hochauflösender Flüssigkeitschromatographie. Zur Strukturaufklärung wurden kernresonanzspektroskopische Experimente und massenspektrometrische Messungen durchgeführt.

- Erstmals konnten aus den Röhrlingen *Porphyrellus pseudoscaber* (Sacc.) Singer und *Xanthoconium affine* (Peck) Singer die Farbstoffe aus der Stiel- und Huthaut isoliert werden. Hauptinhaltsstoff ist hier das Bisnorbadiochinon A (**31**), das bislang nur als Nebenpigment aus *Xerocomus badius* (Fr.) Kühner bekannt war. Neben Norbadien A (**30**) enthält *P. pseudoscaber* Spuren von Badien A (**29**) und *X. affine* Atromentinsäure (**14**).

P. pseudoscaber wurde bislang aufgrund sequenzanalytischer Untersuchungen der Familie der *Strobilomycetaceae* zugeordnet. Das Vorkommen von Pulvinsäurederivaten spricht jedoch für die Eingliederung in die Familie der *Boletaceae*, zumal in diesem Pilz die charakteristischen Inhaltsstoffe der *Strobilomycetaceae* nicht enthalten sind.

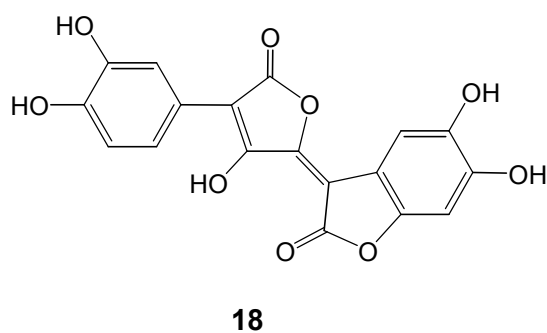
Bei *X. affine* zeigt diese Untersuchung einen nahen Bezug zur Gattung *Boletus*, auch wenn morphologische und molekularbiologische Ergebnisse für die Aufrechterhaltung einer eigenen Gattung sprechen.

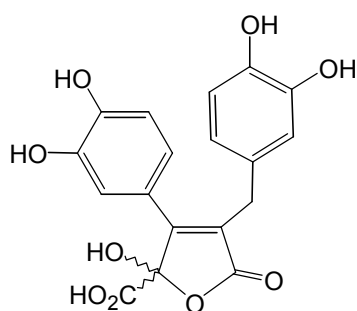
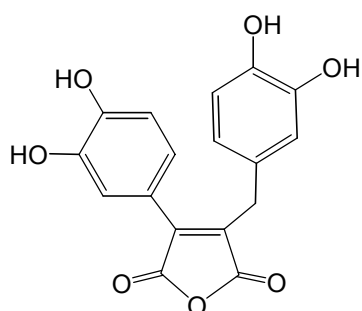




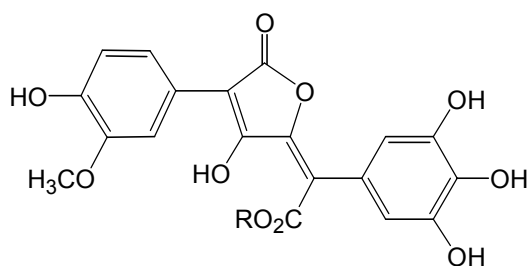
- Ebenfalls aus der Huthaut wurden bei *Boletus erythropus* (Fr.) Pers. zwei Nebenzpigmente isoliert und deren Struktur teilweise aufgeklärt. Es handelt sich dabei auch um dimere Pulvinsäurederivate.

- Der rote Hutfarbstoff von *Leccinum chromapes* (Frost) Singer wurde als Variegatorubin (**18**) identifiziert. Dies ist ungewöhnlich, da der Pilz keine Variegatsäure (**17**) enthält. Die Struktur der nahezu farblosen Begleitverbindung Chromapedsäure (**77**) konnte als 4-(3,4-Dihydroxy-benzyl)-3-(3,4-dihydroxy-phenyl)-2-hydroxy-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-carbonsäure bestimmt und anhand ihres Oxidationsproduktes **84** bestätigt werden. Da *L. chromapes* ausschließlich Farbstoffe des Pulvinsäuretyps enthält, spricht dies für eine Eingliederung der Art in die Gattung *Boletus*.

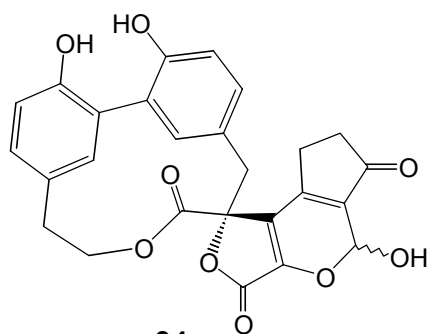


**77****84**

- Erstmals gelangen die Isolierung und die Strukturaufklärung der in *Boletus griseus* Frost apud Peck enthaltenen Farbstoffe. Das neuartige Pulvinsäurederivat (**86**) und dessen Methylester (**88**) unterscheiden *Boletus griseus* pigmentchemisch von *Boletus retipes* Berk. & Curt.. Die Zuordnung von *B. griseus* zur Gattung *Retiboletus* kann deshalb nicht bestätigt werden.

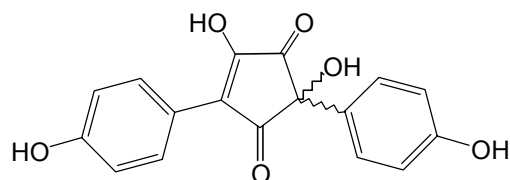
**86** R = H**88** R = CH₃

- Aus neuen Kollektionen von *Boletus retipes* Berk. & Curt. konnte der äußerst oxidationsempfindliche chemotaxonomische Marker isoliert und dessen Struktur vollständig aufgeklärt werden. Die Instabilität der als Isoretipolid A (**94**) bezeichneten Verbindung erklärt sich durch die starke Spannung des Makrolactonringes.

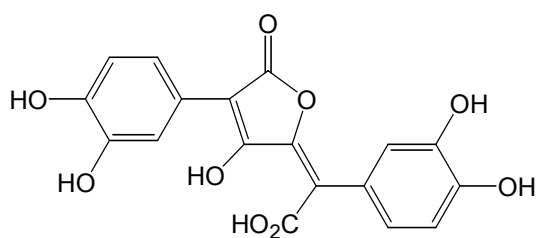
**94**

- Der amerikanische Pilz *Boletus longicurvipes* Snell & Smith zeigt mit Laugen eine chromgelbe Färbung. Als Ursache dieser Reaktion wurde Gyroporin (**39**) identifiziert.

B. longicurvipes unterscheidet sich dadurch deutlich von den anderen, Pulvinsäuren produzierenden Arten der Sektion *Luteoscabra*.

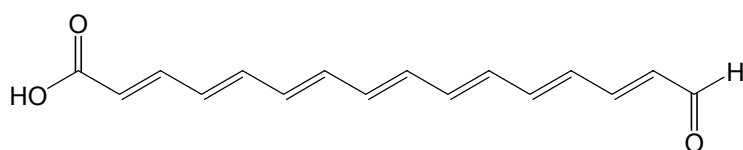
**39**

- In den brasilianischen Röhrlingen *Boletinellus rompelii* (Pat. & Rick) Watling und *Boletinellus exiguus* (Singer & Digilio) Watling wurde Variegatsäure (**17**) gefunden, begleitet von einer Substanz, die auch in *Boletus erythropus* enthalten ist. Das Vorkommen von Variegatsäure (**17**) ist ein weiterer Beweis für die Abgrenzung der Gattung *Boletinellus* von der Gattung *Gyrodon*.

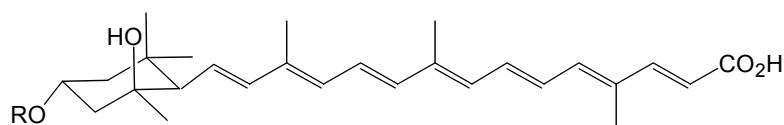
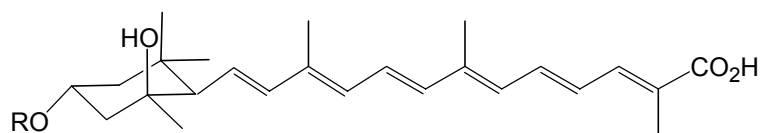
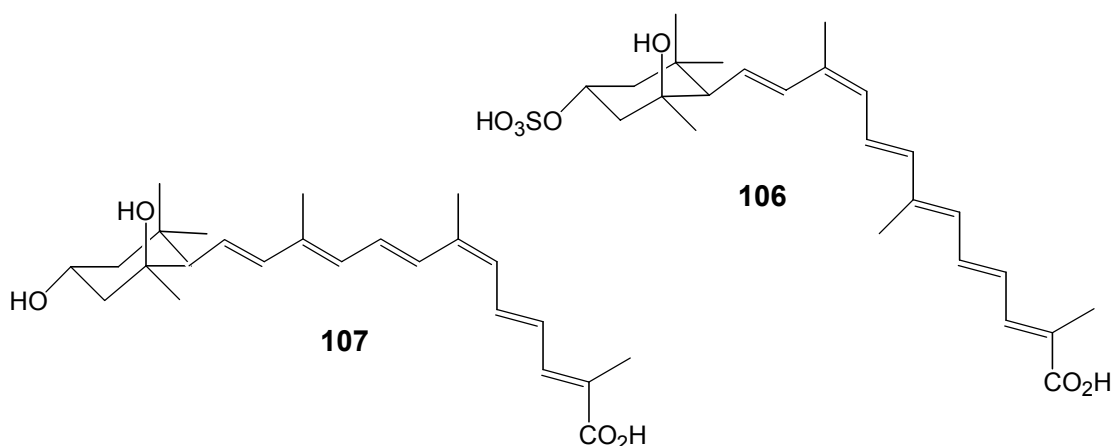
**17**

- Der in den Sporen und der Endoperidie enthaltene Farbstoff des Gastromyceten *Calostoma cinnabarinum* Corda konnte gewonnen und in seiner Struktur als all-*trans*-Hexadecaheptaen-carbonsäurealdehyds **100** aufgeklärt werden.

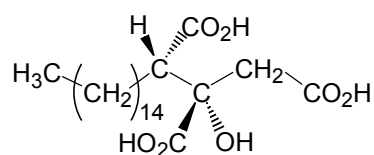
Die strukturelle Ähnlichkeit von **100** mit den aus *Boletus laetissimus* Hongo isolierten Boletocrocinen spricht für die nahe verwandtschaftliche Stellung von *Calostoma cinnabarinum* zur Ordnung der *Boletales*.

**100**

- Die Farbstoffe der europäischen *Clavulinopsis fusiformis* (Fr.) Corner wurden mit den Pigmenten der amerikanischen Spezies verglichen. Dabei wurden die bereits bekannten Apocarotinoide Fusiformin A (**102**), B (**103**), deren Schwefelsäureester **104** und **105** und die Isomere (9Z)-Fusiformin B-3-sulfat (**106**) und (13Z)-Fusiformin B (**107**) nachgewiesen.

**102** R = H**104** R = SO₃H**103** R = H**105** R = SO₃H

- Aus dem Porling *Pycnoporellus fulgens* (Fr.) Donk wurde der Inhaltsstoff Agaricin (**110**) isoliert, der in großen Mengen enthalten ist. Der orangerote Farbstoff des Pilzes bildet mit **110** ein untrennbares Gemisch und konnte nicht aufgeklärt werden.

**110**

1 Einleitung

So vielfältig wie die Erscheinungsformen der Pilze war auch lange Zeit, neben der Nutzung als Nahrungsmittel, deren Verwendung, die sich oftmals in den Namen der Pilze widerspiegelt. So diente früher der Zunderschwamm (*Fomes fomentarius* (L.) Kickx) nicht nur zur Herstellung von Zündhilfen (Zunder), er wurde auch als Wildlederersatz für Hüte und Kleidungsstücke eingesetzt.^[1,2] Aus anderen Vertretern der Porlinge, dem Schuppigen Porling (*Polyporus squamosus* (Huds.) Fr.) und dem Birkenporling (*Polyporus betulinus* (Bull.) Fr.) stellte man Riemen zum Schärfen von Rasiermessern her, den Zimtfarbenen Weichporling (*Polyporus nidulans* Fr.) verwendete man als Flaschenkorken. Wichtig waren auch bestimmte *Coprinus*-Arten (Tintlinge) zur Gewinnung von Schreibtinte. Holzstücke, die mit Hallimasch (*Armillaria mellea* (Vahl) Kumm.) befallen waren, verwendete man wegen ihrer Luminiszenz als Wegmarkierung.^[1]

Einem völlig anderen Zwecke dienten Fliegenpilze (*Amanita muscaria* (L.) Hook.), deren giftige Inhaltsstoffe mehr oder weniger wirksam zur Fliegenbekämpfung eingesetzt wurden.^[1]

Wesentlich bedeutender und älter war jedoch die Verwendung von Pilzen als berauschende Droge und zur Herstellung von Nahrungsmitteln, die auch heute noch sehr bedeutend ist.^[1]

So werden eine Vielzahl von Lebensmitteln mit Hilfe von Hefe- und Schimmelpilzen hergestellt und verfeinert. Als bekannte Beispiele seien *Saccharomyces cerevisiae* Gasp., *Penicillium roqueforti* Sopp und *Aspergillus oryzae* (Ahlb.) Cohn genannt.^[3,4]

Wohl die größte Bedeutung für die Menschen hat heute die Gewinnung von Medikamenten aus Pilzen. Zu den bedeutendsten zählen die Ergotalkaloide, die von *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. gebildet werden und Antibiotika aus Vertretern der Gattungen *Penicillium* und *Aspergillus*.^[5] Darüberhinaus werden Pilze auch zur kostengünstigen Herstellung einfacher organischer Grundsubstanzen eingesetzt, wie beispielsweise *Aspergillus niger* Tiegh. zur Gewinnung von Zitronensäure oder zur gezielten Derivatisierung größerer Strukturen, wie bei der Steroidteilsynthese durch *Aspergillus ochraceus* Wilh..^[5,6]

Vorteil der Biotransformation ist die meist stereospezifische Umwandlung in wenigen Schritten, die chemisch oft nur mit geringen Ausbeuten oder durch zahlreiche Teilschritte erreicht werden kann.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Zur Geschichte der Mykologie

Das scheinbar spontane Entstehen der Basidiomyceten, das schnelle Wachstum der Fruchtkörper und der ebenso rasche Verfall derselben ließ die Pilze für den Menschen lange Zeit geheimnisvoll und unheimlich erscheinen. Lange dachte man sich die Pilze aus Schleim und der überflüssigen Feuchtigkeit der Erde geboren (Plinius). Zudem zeigten sie, verglichen mit Pflanzen, weder Blätter, Wurzeln noch Früchte (Theophrast).^[7]

Die Sporen als Fortpflanzungsorgane der Pilze wurden erstmals 1588 von G. della Porta entdeckt, fast zweihundert Jahre später konnte P. Micheli dies belegen und durch gezieltes Beimpfen von Obst die Bildung eines Myzels hervorrufen.^[1,7]

Doch erst zu Beginn des 19. Jahrhunderts erkannte H. Dutrochet den Zusammenhang zwischen Myzel und den daraus entstehenden Fruchtkörpern als Organe zur Fortpflanzung und widerlegte dadurch die Annahme der spontanen Entstehung der Pilze.^[8]

Nach Einführung der binominalen Systematik durch C. von Linné wurde auch mit der Einordnung der Pilze begonnen. Wegweisend auf diesem Gebiet waren C. H. Persoon und später E. M. Fries, dessen System der Einordnung, basierend auf der Sporenfarbe, teils noch heute Gültigkeit besitzt.^[8]

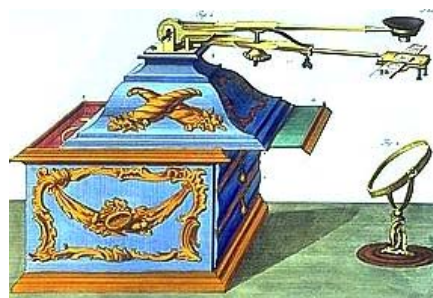


Abbildung 1: Lupe^[9]

Da Pilze bis dahin nur mit schwach vergrößernden Linsen untersucht wurden, dienten nur makroskopisch sichtbare Merkmale wie Fruchtkörperform, Farbe und Oberflächenstruktur des Pilzes und der Bau des Hymenophors als Einordnungskriterien. Mit der Etablierung des Mikroskops war es möglich, immer feinere Strukturen zu erkennen und beispielsweise Form und Oberflächenstruktur der Sporen zur Charakterisierung zu nutzen. Daneben wurden auch Farbreaktionen mit verschiedenen Reagenzien taxonomisch genutzt.

H. de Bary, der als Begründer der modernen Mykologie gilt, widmete sich der Entwicklung und der Biologie der Pilze. Ihm sind grundlegende Kenntnisse auf dem Gebiet der Zytologie der Pilze zuzuschreiben.^[7]

Viele wertvolle Beiträge zur Systematik lieferte vor allem die analytische Chemie durch die Strukturaufklärung der Inhaltsstoffe. So konnten anhand gleicher Inhaltsstoffe auch morphologisch stark unterschiedliche Arten miteinander in Beziehung gesetzt werden. Für viele Gattungen wurden charakteristische Leitpigmente detektiert. Gestützt durch DNA-Analysen lassen sich so viele systematische Fragen klären.^[10]

Die bisher existierenden Systeme sind daher keineswegs endgültig, sondern einem ständigem Wandel unterworfen.

2.2 Einordnung der Pilze

Die Pilze zählen, neben den Pflanzen und Tieren, zum Reich der Eukaryoten. Die in dieser Arbeit untersuchten Pilze gehören alle zur Klasse der Basidiomyceten (Unterklasse der Homobasidiomycetidae), innerhalb der Abteilung Eumycota (Echte Pilze).^[10,11]

Kennzeichen dieser Organismen ist die Bildung eines dikaryontischen, schnallenbildenden Mycels, aus dem der ebenfalls paarkernige Fruchtkörper entsteht. Das Hymenophor (Träger der Fruchtschicht) entwickelt Basidien, die 4 (selten auch 2) Basidiosporen tragen.^[11]

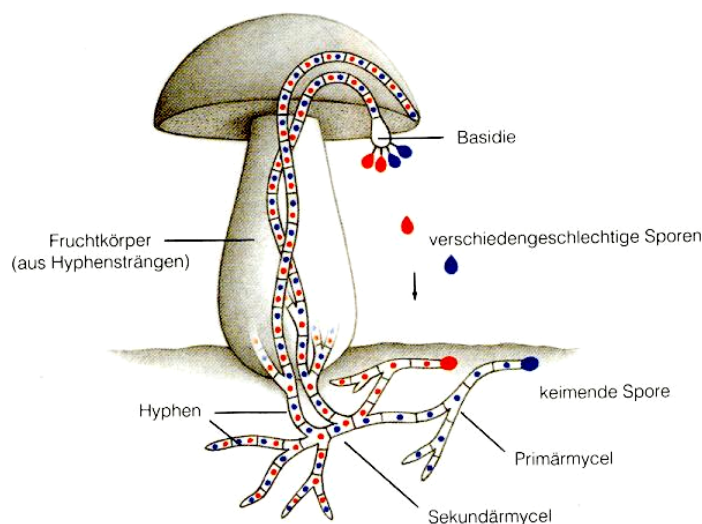


Abbildung 2: Schema der Entwicklung eines Basidiomyceten^[12]

Der Großteil dieser Arbeit widmet sich der Untersuchung von Vertretern der Ordnung *Boletales*, erstmals 1931 von Gilbert aufgestellt. Diese umfaßt nach bisherigem Stand vier Unterordnungen mit insgesamt neun Familien.^[13,14]

- *Paxillineae* (*Coniophoraceae*, *Paxillaceae*, *Gyrodontaceae*, *Omphalotaceae*)
- *Boletineae* (*Boletaceae*)
- *Strobilomycetinae* (*Strobilomycetaceae*)
- *Suillineae* (*Gomphidiaceae*, *Rhizopogonaceae*, *Suillaceae*)

Desweiteren wurden Vertreter der Ordnungen *Aphyllphorales* (Familie *Clavariceae*), *Polyporales* (Familie *Polyporaceae*) und *Sclerodermatales* (Familie *Calostomaceae*) untersucht.

Für die Familie der *Boletaceae* ist die Ausbildung eines röhrenförmigen, selten lamellenförmigen Hymenophors charakteristisch. Form und Größe der Röhren und Poren sind sehr variabel. Die Farben der Poren reichen von weiß, gelb, rot bis braun, das Fruchtfleisch ist meist weiß, gelb oder grau gefärbt. Bei Verletzung oder Druck tritt oft eine Blau-, Grün-, Rot- oder Schwarzfärbung auf. Auch wenn einige Arten einen bitteren oder scharfen Geschmack besitzen, so sind auch viele mild schmeckende Pilze dieser Familie als Speisepilze geschätzt.^[15]

Pilze der Gattungen *Boletus*, *Boletinellus*, *Leccinum*, *Xanthoconium* und *Porphyrellus* aus der Familie der *Boletaceae* sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Vor allem in der englischsprachigen Literatur werden die Gattungen *Tylopilus* und *Xerocomus* ebenfalls zu *Boletus* gestellt.^[13]

2.3 Charakteristische Sekundärmetabolite der *Boletales*

Viele Inhaltsstoffe in Pilzen der Ordnung der *Boletales* können als charakteristisch innerhalb der Gattungen angesehen werden, als wichtigste seien die Grevilline, Terphenylchinone Diarylcyclopentenone und Pulvinsäurederivate genannt. Die Ausgangsverbindungen dieser Substanzen, meist Tyrosin, entstammen dem Shikimatweg.^[16]

Die enge Verknüpfung der Biosynthesewege der Grevilline, der Terphenylchinone und der Pulvinsäuren erklärt das Auftreten verschiedener Verbindungsklassen nebeneinander innerhalb eines Pilzes.

Folgendes Schema zeigt die verwandtschaftlichen Beziehungen der Gattungen innerhalb der *Boletales* auf der Grundlage pigmentchemischer Untersuchungen.^[10]

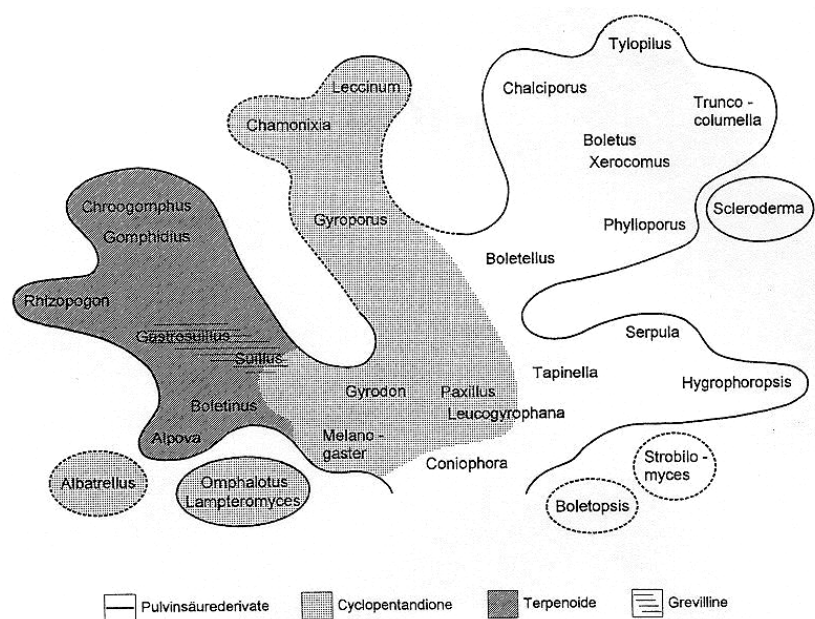


Abbildung 3: Pigmentverteilung innerhalb der *Boletales*^[10]

2.3.1 Grevilline

Innerhalb der Gattung der Schmierröhrlinge (*Suillus*) werden die gelben bis roten Färbungen durch die Grevilline hervorgerufen. So enthalten *Suillus grevillei* (Klotzsch) Singer und *Suillus tridentinus* (Bres.) Singer neben Grevillin C (**3**) auch die beiden Grevilline A (**1**) und B (**2**).^[17] Der Farbstoff Grevillin D (**4**) ist vor allem in Arten der Subsektionen *Angustiporini* und *Latiporini* weit verbreitet.^[18]

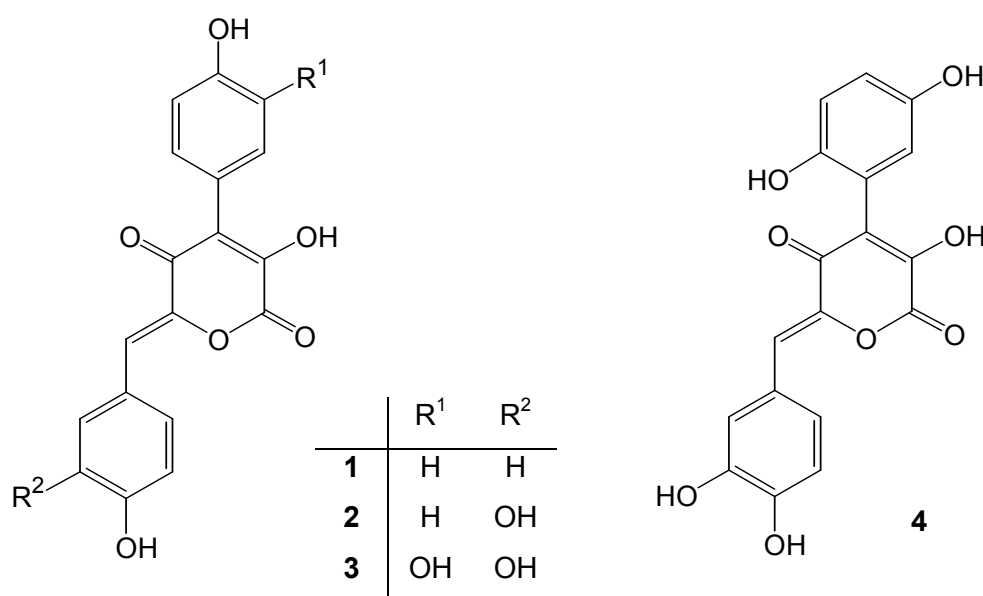


Abbildung 4: Die Grevilline A (**1**), B (**2**), C (**3**) und D (**4**)

2.3.2 Terphenylchinone

Zur Verbindungsklasse der Terphenylchinone gehört Atromentin (**6**), das auch als Schlüsselverbindung für die Biosynthese vieler anderer Pilzinhaltsstoffe diskutiert wird.^[16,19] Es konnte erstmals aus *Paxillus atrotomentosus* (Batsch) Fr. isoliert werden, ist aber auch in *Suillus bovinus* (Pers.) Kuntze und vielen anderen Basidiomyceten enthalten.^[20] Der Samtfußkrempling (*Paxillus atrotomentosus*) enthält außerdem die farblosen Metabolite Leucomentin-3 (**8**) und Leucomentin-4 (**9**), die beide bei der Aufarbeitung leicht zu **6** hydrolysieren.^[21] Das ebenfalls in *Paxillus* vorkommende Flavomentin A (**7**), ein mit zwei 4,5-Epoxy-2-hexensäureresten verestertes Atromentinderivat, gehört zur Gruppe der gelben bis violettroten Flavomentine.^[22,23]

Als erster Vertreter der 3,6-Diaryl-1,4-benzochinone wurde die Polyporsäure (**5**) aus *Polyporus nidulans* Fr. isoliert, die sich biosynthetisch vom Phenylalanin ableitet.^[24] Der Porling *Boletopsis leucomelaena* (Pers.) Fayod enthält Cycloleucomelon (**10**), ein Derivat der Thelephorsäure (**11**). Letztere gilt in der Familie der *Thelephoraceae* als Leitpigment.^[16,23,25]

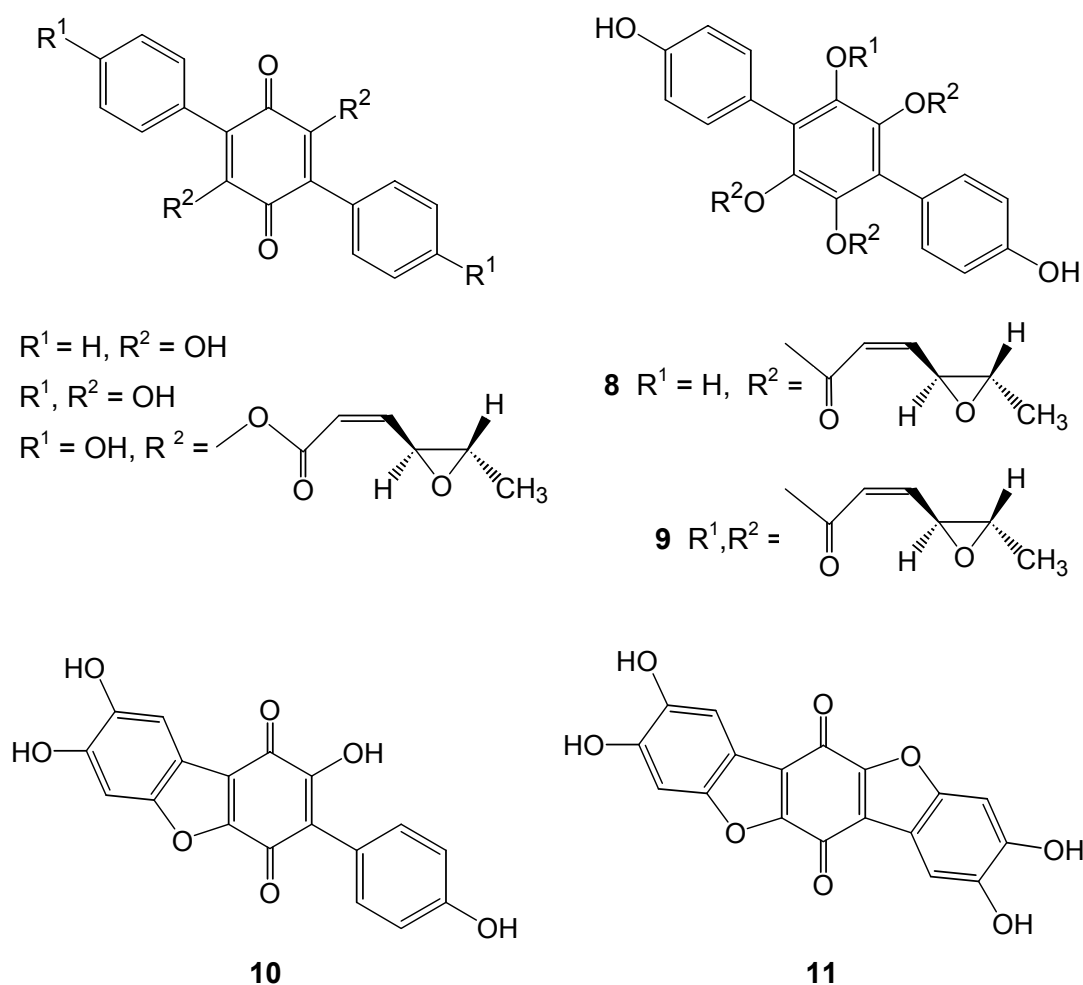


Abbildung 5: Verbindungen aus der Klasse der Terphenylchinone

2.3.3 Hydroxypulvinsäuren

Die Hydroxypulvinsäuren sind innerhalb der *Boletales* weit verbreitet und konnten unter anderem in den Gattungen *Boletus*, *Boletinus*, *Chalciporus*, *Gyrodon*, *Leccinum*, *Pulveroboletus*, *Suillus* und *Xerocomus* nachgewiesen werden.^[16,20] Der Nachweis von Pulvinsäuren in agaricoiden, gastroiden und aphylophoren Gattungen ist ein wertvoller Hinweis zur verwandtschaftlichen Beziehung innerhalb der *Boletales*.^[13,26,27]

Die Strukturen leiten sich ab von der Pulvinsäure (**12**), einem Inhaltsstoff zahlreicher Flechten, die erstmals in Form ihres Methylesters **13** aus *Letharia vulpina* (L.) Hue, ebenfalls einer Flechte, isoliert werden konnte.^[28,29] Später konnte die Vulpinsäure (**13**) auch aus einem Basidiomycet, dem japanischen *Pulveroboletus ravenelii* (Berk. & Curt.) Murrill, isoliert werden.^[30]

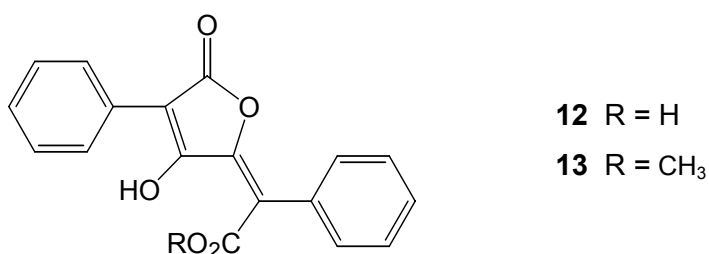


Abbildung 6: Pulvinsäure (**12**) und ihr Methylester Vulpinsäure (**13**)

Die gelben und rötlichen Farben der Boleten werden durch Hydroxypulvinsäuren hervorgerufen, von denen inzwischen zahlreiche Strukturen bekannt sind. Zu den häufigsten Vertretern zählen Atromentinsäure (**14**), Xerocomsäure (**15**), Isoxerocomsäure (**16**) und Variegatsäure (**17**)^[16], die sich biosynthetisch ebenfalls vom Atromentin (**6**) ableiten.

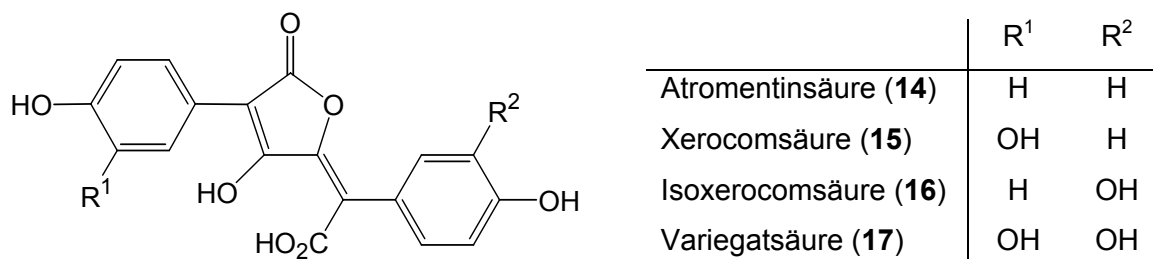


Abbildung 7: Struktur der Hydroxypulvinsäuren **14**, **15**, **16** und **17**

Die häufig auftretende rote Färbung, beispielsweise bei *Xerocomus chrysenteron* (Bull.) Quél. und *Boletus erythropus* (Fr.) Pers., entsteht durch Oxidation von Variegatsäure (**17**) zum Variegatorubin (**18**).^[31]

Die Reaktion kann auch *in vitro* durch Wasserstoffperoxid mit Kupfer als Katalysator durchgeführt werden.^[20] Durch die Bildung des zweiten Lactonringes entsteht ein planares und dadurch vollständig konjugiertes System, was eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums zur Folge hat. Analog dazu kann **16** zum Xerocomorubin (**19**) oxidieren, welches in Kulturen von *Serpula lacrymans* (Wulfen) Schröt. nachgewiesen wurde.^[32]

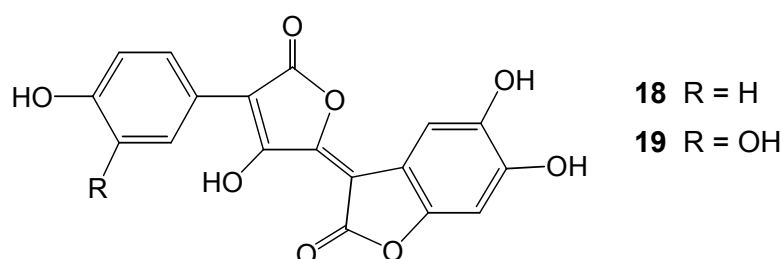


Abbildung 8: Variegatorubin (**18**) und Xerocomorubin (**19**)

Die oftmals beobachtete Blaufärbung bei Druck oder Verletzung der Pilze wird durch die enzymatische Oxidation von Variegatsäure (**17**) oder Xerocomsäure (**15**) zum Chinonmethid-Anion **20** bzw. **21** hervorgerufen. *In vitro* kann diese Reaktion durch schwache Oxidationsmittel wie alkalische Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung oder Kartoffelpreßsaft hervorgerufen werden.^[33] Voraussetzung für die Bildung dieses Anions ist die 3,4-Dihydroxysubstitution des Ringes A.

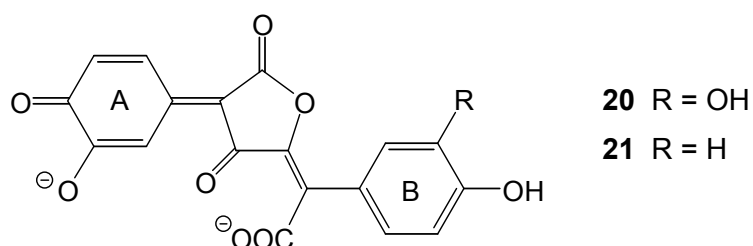


Abbildung 9: Die blauen Chinonmethid-Anionen **20** und **21**

2.3.4 Ungewöhnliche Pulvinsäurederivate

Neben den Hydroxypulvinsäuren konnte auch eine Vielzahl methylierter Pulvinsäuren isoliert werden. Der Falsche Pfifferling (*Hygrophoropsis aurantiaca* (Wulfen) Maire) bildet in Kultur die mono-, di- und permethylierten Variegatsäurederivate **22**, **23** und **24**.^[21]

Die beiden erstgenannten Verbindungen wurden kürzlich auch in dem japanischen Pilz *Tylophilus nigerrimus* (Heim) Hongo & Endo nachgewiesen.^[34]

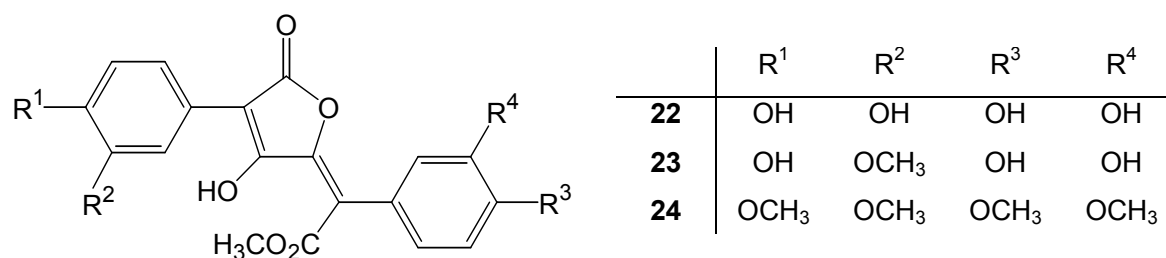


Abbildung 10: Variegatsäure-methylester (**22**), 3-*O*-Methylvariegatsäure-methylester (**23**) und 3,3',4,4'-Tetra-*O*-methylvariegatsäure-methylester (**24**)

Desweiteren konnten auch chlosubstituierte Hydroxypulvinsäuren isoliert werden, obwohl das Vorkommen halogenhaltiger Substanzen für terrestrische Organismen eher ungewöhnlich ist. So enthält *Pulveroboletus auriflammeus* (Berk. & Curt.) Sing. 3'-Chlor-4,4'-di-*O*-methyl-atromentinsäure-methylester (**25**) und 2'-Chlor-3,4,4'-tri-*O*-methylxerocomsäure-methylester (**26**).^[30,33]

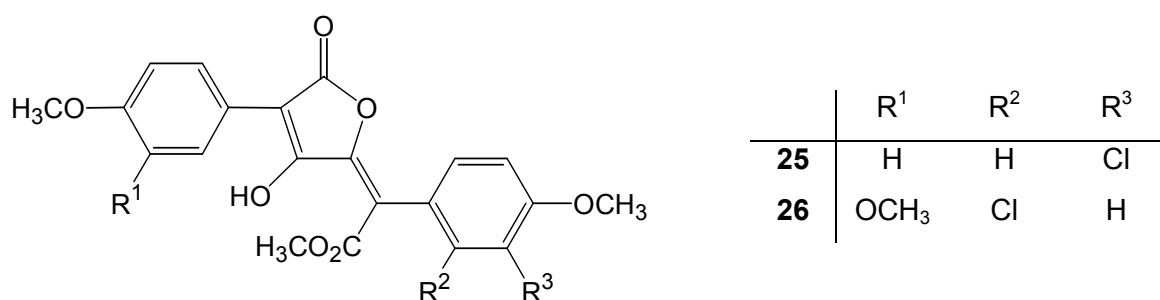


Abbildung 11: Chlosubstituierte Hydroxypulvinsäuren **25** und **26**

Eine ungewöhnliche Struktur besitzt auch Methylbovinat (**27**), das aus Kulturen von *Suillus bovinus* (Pers.) Kuntze gewonnen wurde, da es ein zusätzliches Kohlenstoffatom in einem Lactonring enthält.^[20,35,36]

Vermutlich durch Decarboxylierung entstanden ist das Pulvinon **28**, ein Farbstoff des Goldröhrlings (*Suillus grevillei* (Klotzsch) Singer), der erstmals von Edwards und Gill isoliert werden konnte.^[37]

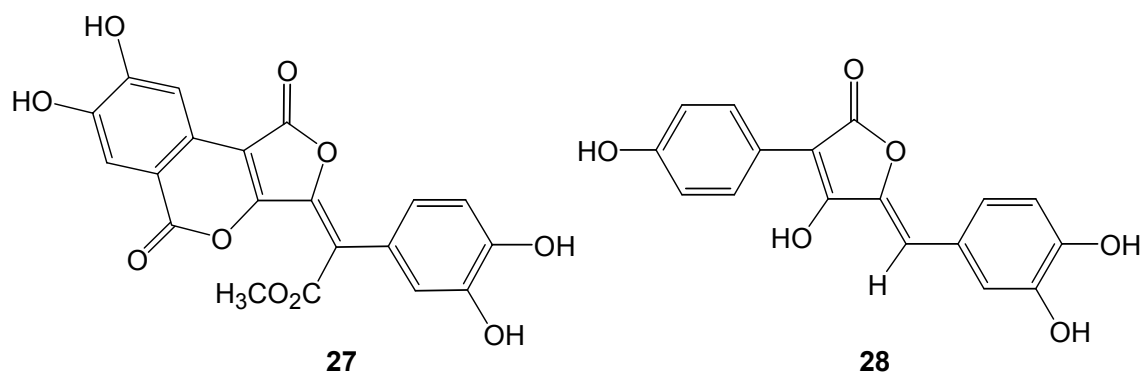


Abbildung 12: Methylbovinat (**27**) und das Pulvinon **28**

2.3.5 Dimere Pulvinsäurederivate

Ein Teil dieser Arbeit ist den Badionen gewidmet, die als Dimerisierungsprodukte der Pulvinsäuren aufzufassen sind. Die ersten Verbindungen dieser Klasse konnten von Steffan aus der Huthaut des Maronenröhrlings (*Xerocomus badius* (Fr.) Kühner) isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt werden.^[38,39] Badion A (**29**) und seine Derivate Norbadion A (**30**) und Bisnorbadiochinon A (**31**) entstehen aus zwei Molekülen Xerocomsäure (**15**), die biosynthetisch wahrscheinlich durch [4+2]-Cycloaddition miteinander verknüpft werden.^[40] Der Beweis der Dimerisierung durch die pilzeigenen Enzyme, ausgehend von **15**, konnte bereits von Steffan erbracht werden.^[39]

Im Flockenstieligen Hexenröhrling (*Boletus erythropus* (Fr.) Pers.) wird die braune Farbe des Hutes durch Badion B (**32**) hervorgerufen, das sich aus zwei Variegatsäureeinheiten zusammensetzt.^[39]

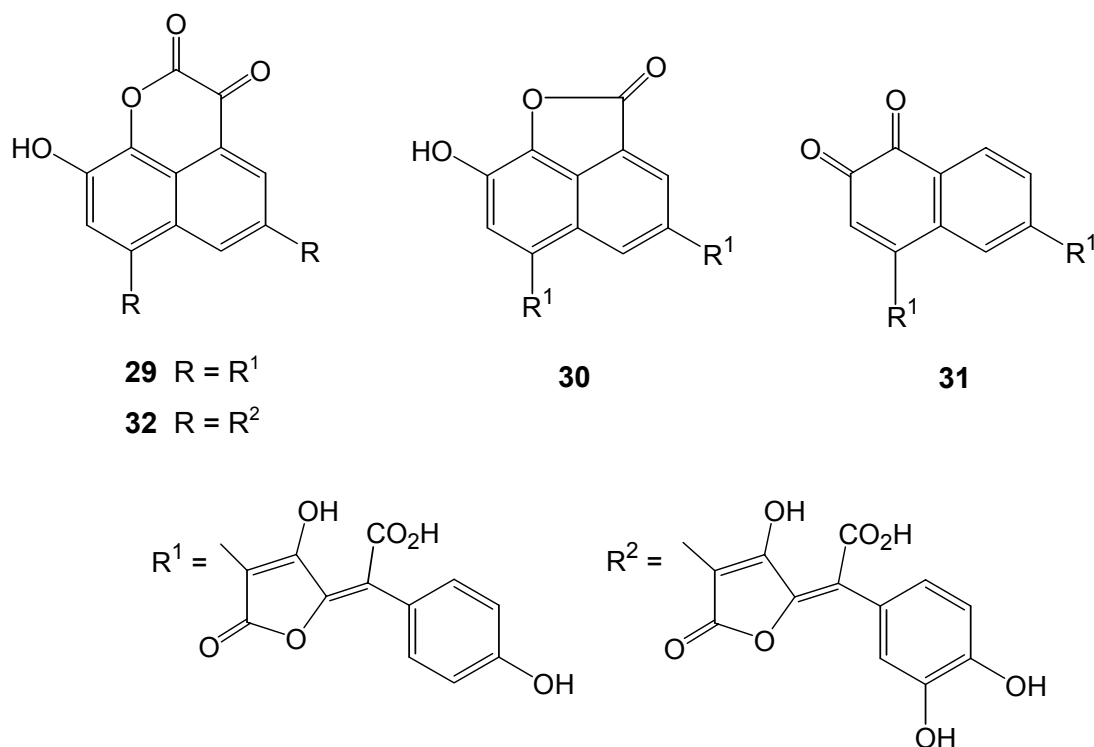


Abbildung 13: Badion A (**29**), B (**32**), Norbadion A (**30**) und Bisnorbadiochinon A (**31**)

Auch in verschiedenen Gastromyceten sind Pigmente der Badion-Gruppe enthalten. Aus *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch konnte ebenfalls Norbadion A (**30**) isoliert werden, welches in weißhäutigen Exemplaren von PISOCHINON (**33**) begleitet wird.^[41,42] Ebenso bildet *Scleroderma citrinum* Pers. **29** und **30**. Der Hauptinhaltsstoff, Sclerocitrin (**34**) besitzt eine ungewöhnlichere Triquinan-Struktur^[43] und konnte auch in *Chalciporus piperatus* (Bull.: Fr.) Bat. nachgewiesen werden.^[20,43]

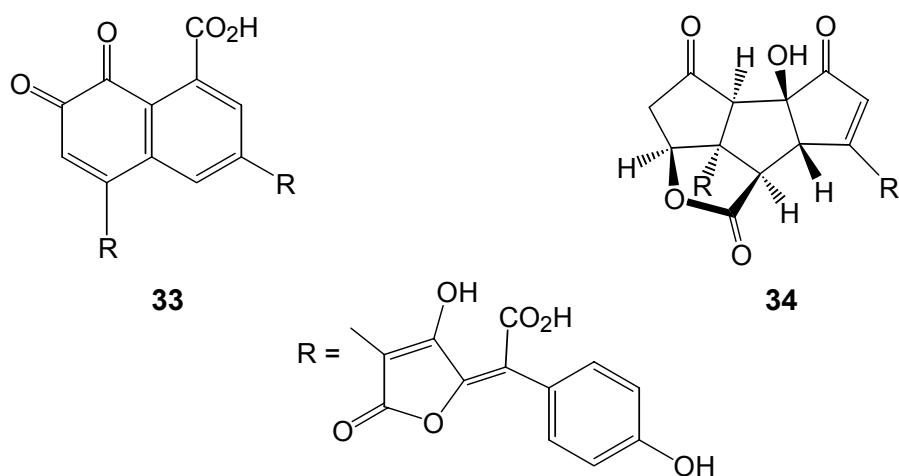


Abbildung 14: PISOCHINON (**33**) und Sclerocitrin (**34**)

2.3.6 Diarylcyclopentenone

Ebenfalls vom Atromentin (**6**) leitet sich die Struktur der 2,5-Diarylcylopentenone ab.

In vitro kann aus Atromentin (**6**) durch oxidative Ringverengung Gyrocyanin (**35**) und daraus (–)-Involutin (**36**) und (–)-(4*S*,5*R*)-Chamonixin (**37**) hergestellt werden.^[44,45] Das enantiomere (+)-(4*R*,5*S*)-Chamonixin (**38**) wurde erstmals aus dem Pilz *Chamonixia caespitosa* Rolland isoliert. Im Kahlen Krempling (*Paxillus involutus* (Batsch) Fr.) ist das farblose (–)-Involutin (**36**) zusammen mit **37** enthalten und verursacht die braunen Verfärbungen bei Verletzung des Pilzes.^[46,47]

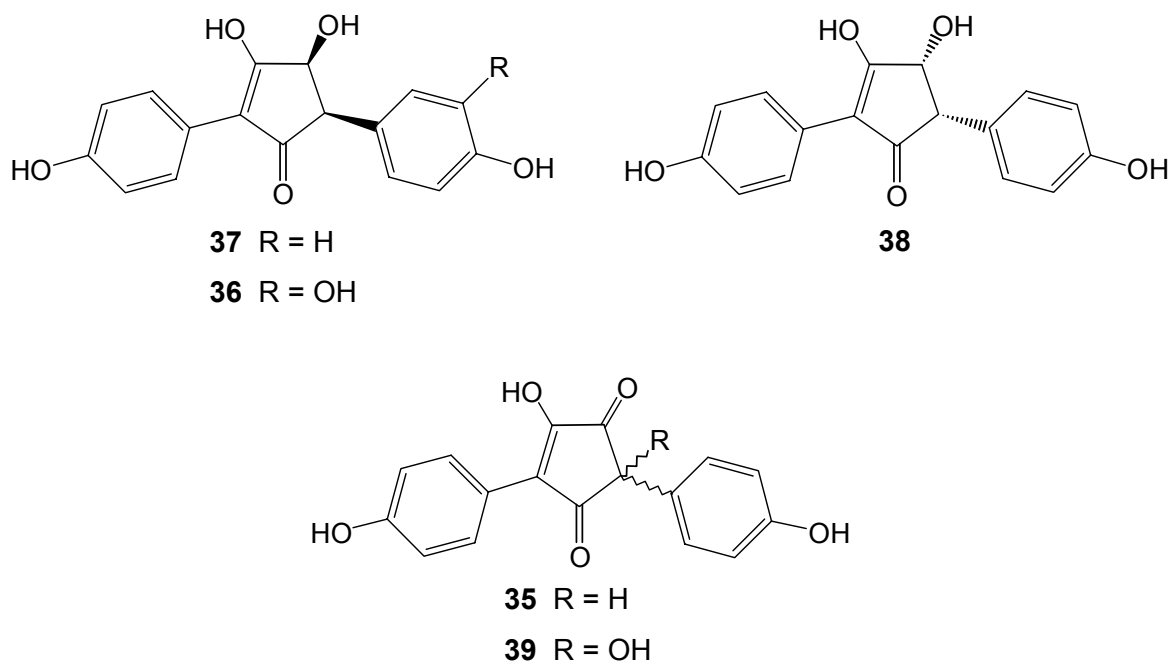


Abbildung 15: Die 2,5-Diarylcylopentenonderivate **35**, **36**, **37**, **38** und **39**

Aus Fruchtkörpern des Kornblumenröhrlings (*Gyroporus cyanescens* (Bull.) Quél.) wurden die beiden gelben Verbindungen Gyroporin (**39**) und Gyrocyanin (**35**) isoliert. Letzteres verursacht die rasche Blaufärbung des Pilzes bei Druck oder Verletzung. Bei Oxidation bildet sich ein blaues Chinonmethidanion **40**, welches zu **39** weiterreagieren kann.^[44]

In einigen hellfleischigen Arten der Gattung *Leccinum* wurden **35** und **39** nachgewiesen.^[18,48] Cyclopentenon-Derivate treten aber auch vereinzelt in *Suillus*-Arten, in *Gyrodon lividus* (Bull.) Fr., *Albatrellus ellisii* Berk. und *Melanogaster broomeianus* Berk. auf.^[45,46,49]

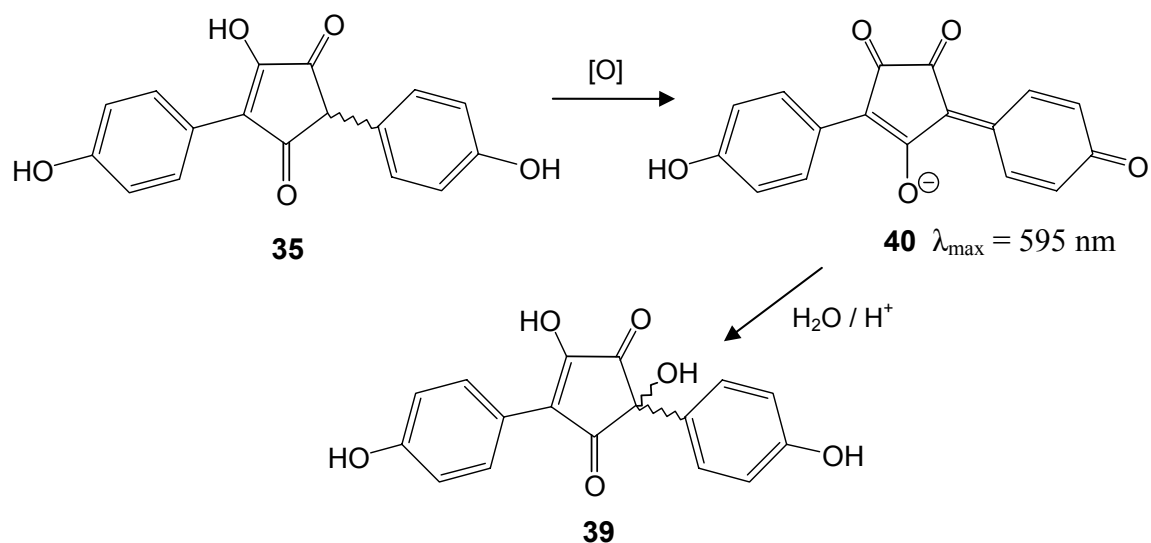


Abbildung 16: Oxidation von Gyrocyanin (35)

2.4 Biosynthese der vom Atromentin abgeleiteten Inhaltsstoffe

Der Shikimisäureweg ist ein wichtiger Biosyntheseweg zur Bildung aromatischer Verbindungen. Aus ihm entstammen die Bausteine vieler Sekundärmetabolite, wie beispielsweise Anthranilsäure (41), 4-Hydroxybenzoesäure (42) und die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (43), Tryptophan (44) und Tyrosin (45).^[50,51]

Tyrosin wiederum ist die Ausgangsverbindung vieler chemotaxonomisch relevanter Inhaltsstoffe in Pilzen.^[16]

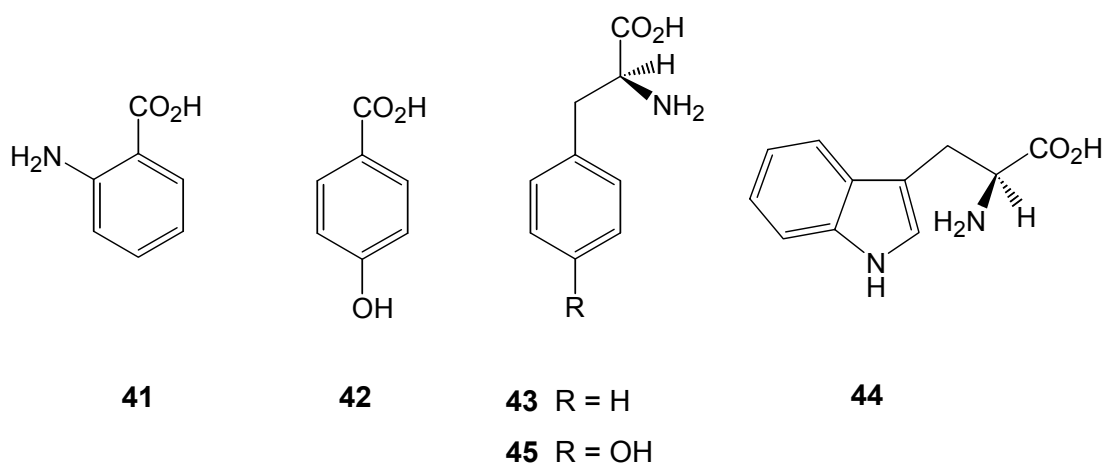


Abbildung 17: Aromatische Verbindungen aus dem Shikimisäureweg

Durch Transaminierung von **45** zur 4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure (**46**) und anschließende Dimerisierung entsteht die Zwischenstufe **47**, aus der durch C-O-Verknüpfung Grevillin A (**1**) gebildet wird. Die Hydroxylierung im Pilz zu Grevillin B und D konnte bereits durch Verimpfungsexperimente von Herrmann bewiesen werden.^[52]

Die Ringbildung durch C-C-Verknüpfung führt zum Atromentin (**6**), dem Grundkörper der Terphenylchinone. Aus **6** können nach oxidativer Ringverengung die Pulvinsäuren entstehen bzw. nach Decarboxylierung die 2,5-Diarylcyclopentenone.

Die Bildung von Atromentinsäure (**14**) aus Atromentin (**6**) konnte bereits *in vivo* nachgewiesen werden.^[52] Man nimmt an, daß **14** die Ausgangsverbindung für die höher hydroxylierten Pulvinsäurederivate ist.^[52]

Für die Entstehung der Diarylcyclopentenone werden verschiedene Wege diskutiert. Ausgehend von **6** gelangt man durch oxidative Ringverengung und Decarboxylierung zum Gyrocyanin (**35**). Möglicherweise entsteht **35** auch durch eine Umlagerung und Decarboxylierung von Atromentinsäure (**14**). Eine anderer Vorschlag der Biosynthese geht direkt von **47** aus, welches decarboxyliert und zum Gyrocyanin (**35**) umgelagert wird.^[45]

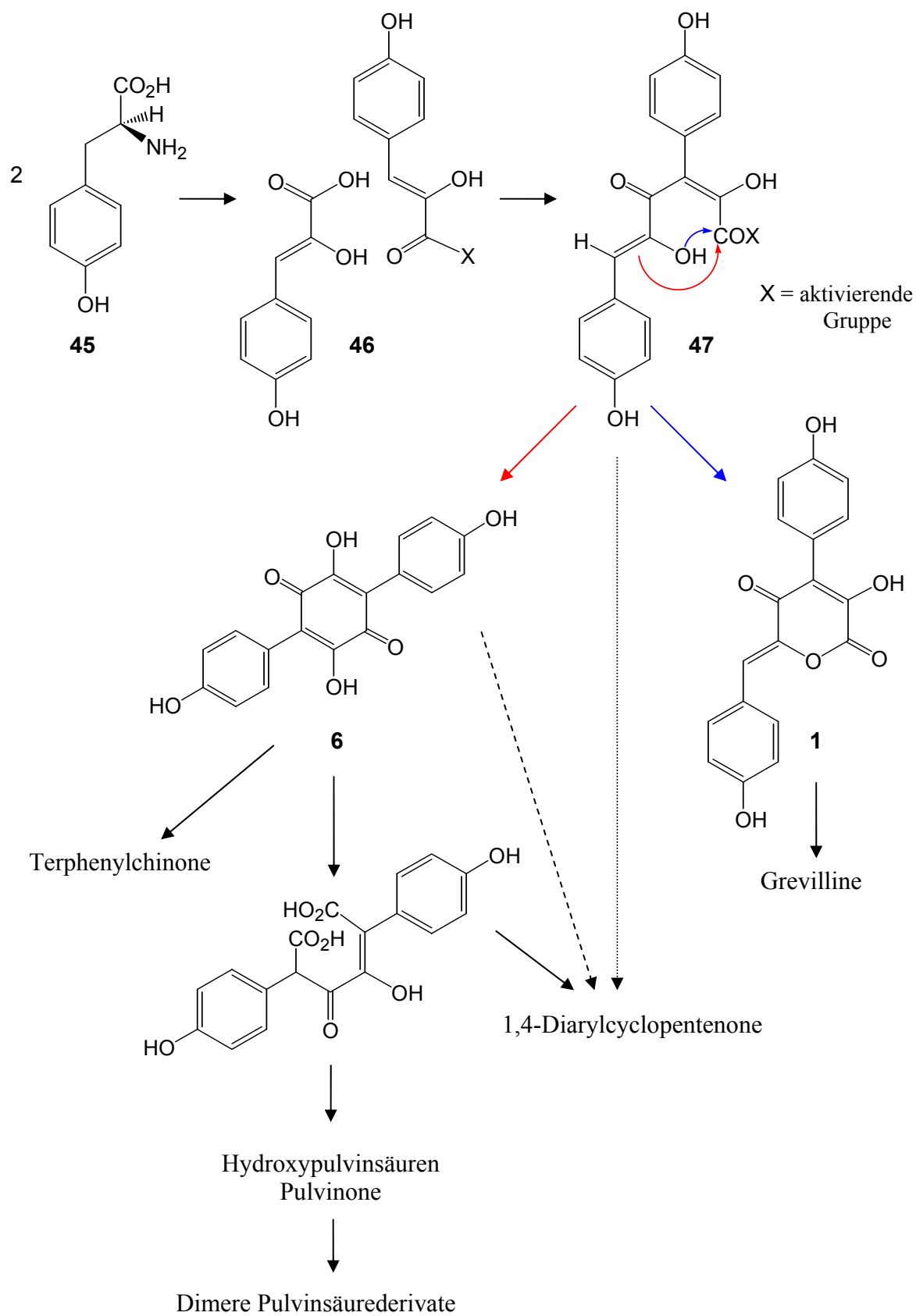


Abbildung 18: Biosynthetische Zusammenhänge der verschiedenen Sekundärmetaboliten der Boletales^[16,52]

2.5 Sekundärmetabolite aus anderen Biosynthesewegen

2.5.1 Prenylierte 1,4-Benzochinone

Eine andere Farbstoffklasse, die auch aus Vertretern der Gattung *Suillus* isoliert wurde, sind die prenylierten 1,4-Benzochinone. Diese leiten sich biosynthetisch von einer 4-Hydroxybenzoesäure-Einheit ab, die mit einer Isoprenoid-Seitenkette verknüpft ist. Für die Biosynthese des Tridentochinons (**48**) konnte dies bereits durch Verfütterungsexperimente bewiesen werden.^[53]

Das aus *Suillus bovinus* (Pers.) Kuntze isolierte Bovichinon-4 (**49**) trägt eine um eine Isopreneinheit längere Seitenkette als Bovichinon-3 (**50**), welches in *Chroogomphus rutilus* (Schaeff.) Mill. und *Chroogomphus helveticus* (Singer) Moser enthalten ist.^[26,54] Der rote Farbstoff des Rostroten Lärchenröhrlings (*Suillus tridentinus* (Bres.) Singer), das Tridentochinon (**48**), weist große Ähnlichkeit mit dem aus *Rhizopogon pumilionus* (Ade) Bataille gewonnenen Rhizopogon (**51**) auf.^[55,56,57]

Auch hier läßt das Vorkommen ähnlicher Verbindungen auf eine nahe verwandtschaftliche Stellung zwischen gastroiden und boletoiden Pilzen schließen.

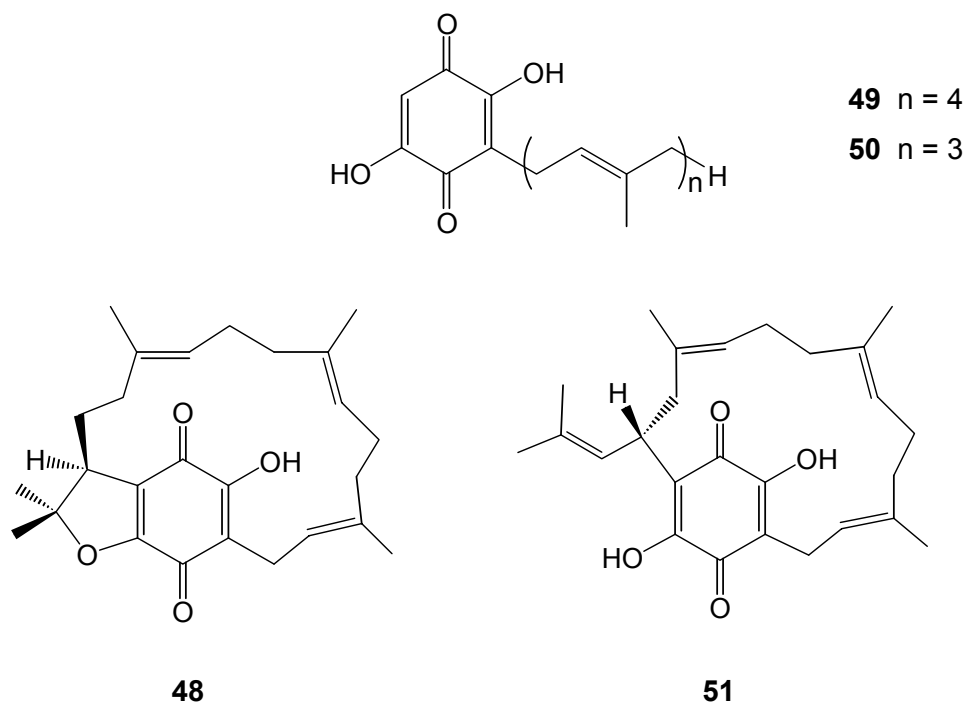


Abbildung 19: Prenylierte 1,4-Benzochinone aus Basidiomyceten

2.5.2 Calopine

Zu einer völlig anderen Verbindungsklasse zählen die Calopine, deren Vertreter Calopin (**52**) und *O*-Acetylcopin (**53**) erstmals von Dasenbrock^[58] als Coniferon B und Coniferon C isoliert und aufgeklärt wurden. Die bitter schmeckenden δ -Lactone sind, neben vielen ähnlichen Spiroverbindungen, wie Cyclocalopin A (**54**), *O*-Acetylcyclocalopin A (**55**) und Cyclocalopin D (**56**) auch in den Röhrlingen *B. radicans* Pers. und *B. coniferarum* Dick & Snell sowie anderen bitter schmeckenden Arten nachzuweisen.^[34,59,60]

Trotz umfangreicher Untersuchungen ist die Biosynthese der Calopine noch ungeklärt, die Anzahl der Kohlenstoffe und das Substitutionsmuster der Calopin-Strukturen lassen jedoch die Entstehung über einen terpenoiden Biosyntheseweg möglich erscheinen.^[59]

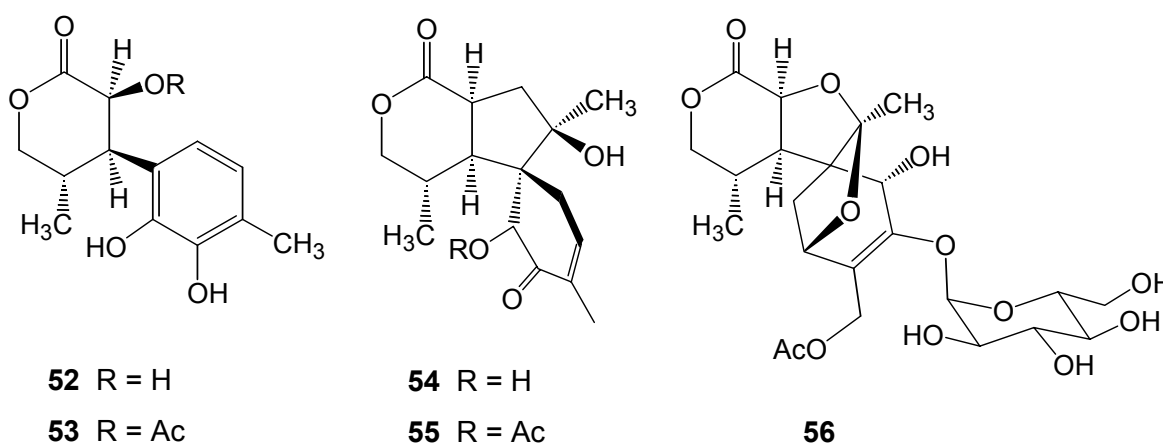


Abbildung 20: Die Calopine **52**, **53**, **54**, **55** und **56**

2.5.3 Retipolide

Aus den ebenfalls bitter schmeckenden Pilzen *Boletus ornatipes* Peck bzw. *Boletus retipes* Berk. & Curt. konnten die Retipolide A (**57**), B (**58**), C (**59**), D (**60**) und E (**61**) gewonnen werden, die auch die gelbe Färbung des Pilzes verursachen.^[59,61] Durch das Vorkommen von Retipoliden grenzt sich die Gattung *Ornatiboletus* innerhalb der *Boletaceae* klar von *Boletus* ab.

Die instabile Macrolactonstruktur der Verbindungen konnte von Justus erst nach Stabilisierung durch Derivatisierung zum Retipolid-Methoxyfulven aufgeklärt werden.^[61] Die Bildung der Retipolide über *seco*-Retipolid E (**62**) als Zwischenstufe konnte bis heute nicht bestätigt werden. Der von Justus und Steglich formulierte Vorschlag, ausgehend von Tyrosin, würde die Retipolide wieder dem Shikimatweg zuordnen.^[61]

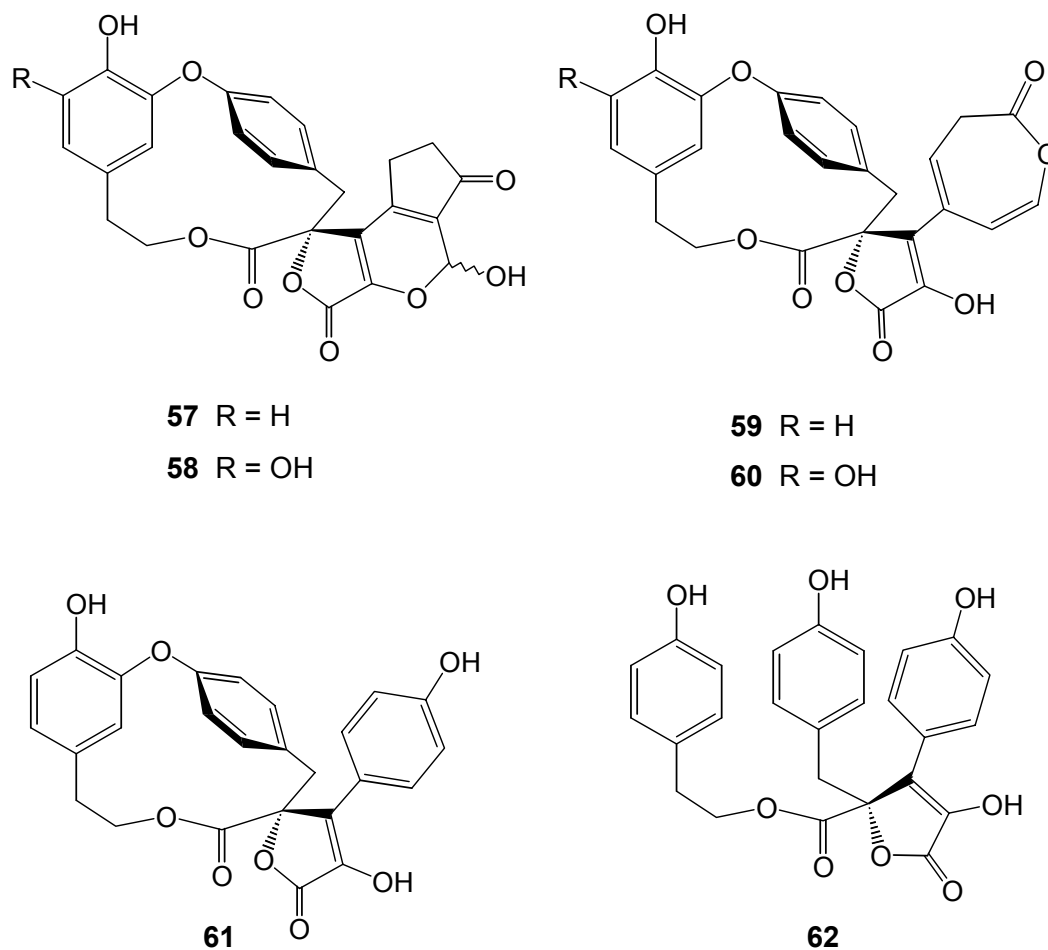


Abbildung 21: Retipolid A (**57**), B (**58**), C (**59**), D (**60**) und E (**61**)
sowie *seco*-Retipolid E (**62**)

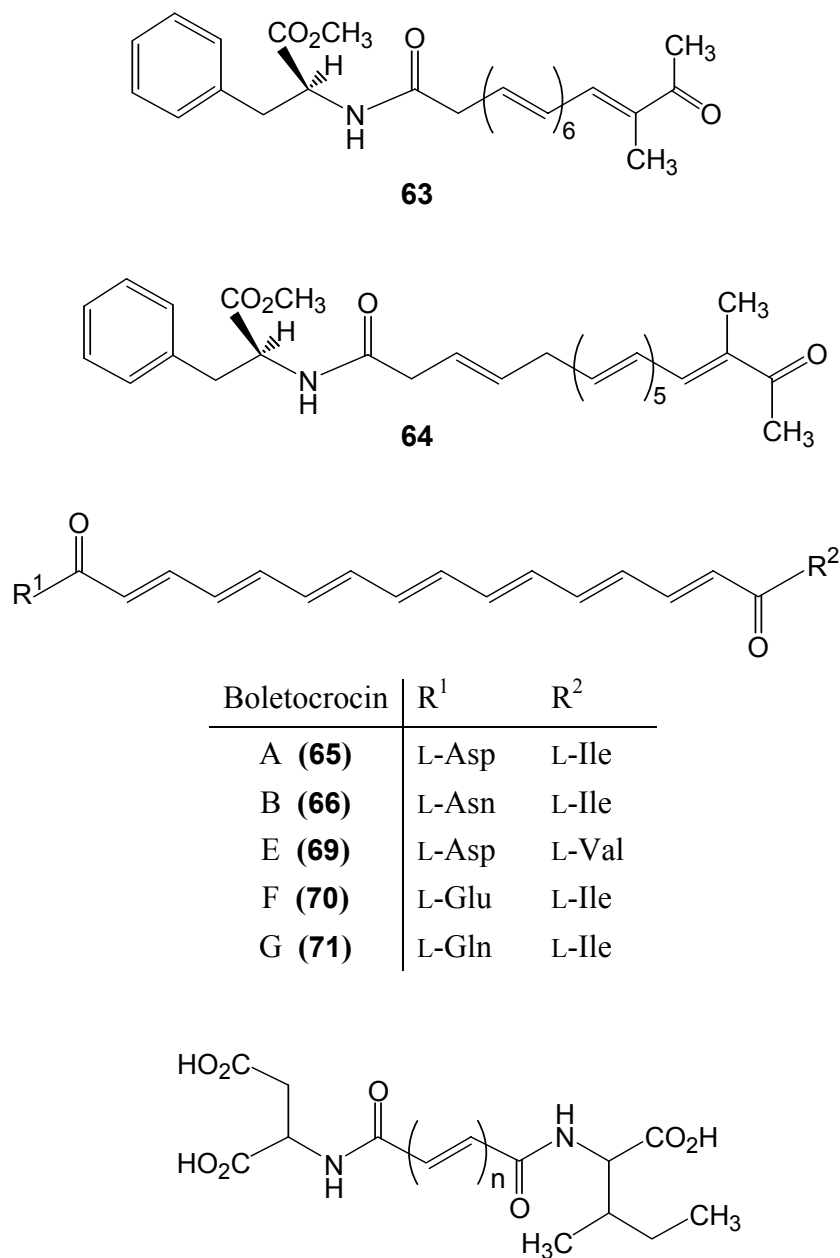
2.5.4 Melanocrocine und Boletocrocine

Eine neue Gruppe von Pigmenten innerhalb der *Boletales* stellen die Boletocrocine und Melanocrocine dar. Die Melanocrocine A (**63**) und B (**64**) wurden von Aulinger aus dem hypogäisch wachsenden Pilz *Melanogaster broomeianus* Berk. in Tul. isoliert.^[49] Sie besitzen eine Polyeneinheit, welche peptidisch mit L-Phenylalanin verknüpft ist. Die Biosynthese der Polyenseitenkette aus Acetateinheiten konnte bereits durch Verfütterungsexperimente mit ¹³C-markiertem Natriumacetat an Submerskulturen belegt werden.^[49]

Die den Melanocrocinen sehr ähnlichen Boletocrocine A (**65**), B (**66**), C (**67**), D (**68**), E (**69**), F (**70**) und G (**71**) wurden erstmals von Kahner in den asiatischen Pilzen *Boletus laetissimus* Hongo und *Boletus rufo-aureus* Massee entdeckt.^[34] Anders als bei den Melanocrocinen ist die Polyenkette der Boletocrocine mit zwei Aminosäuren verbunden.

Es ist anzunehmen, daß die Boletocrocine, ebenso wie die Melanocrocine, über den Acetat-Malonat-Biosyntheseweg gebildet werden.^[34,49]

Das Vorkommen strukturell sehr ähnlicher Verbindungen bestätigt auch bei *M. broomeianus* die verwandtschaftlich enge Beziehung gastroider Pilze zur Ordnung der *Boletales*.



Boletocrocin C (**67**) n = 5

Boletocrocin D (**68**) n = 6

Abbildung 22: Melanocrocin A (**63**), B (**64**) und die Boletocrocine A (**65**) – G (**71**)

2.5.5 Chalciporon

Die Verbindung **72**, die den scharfen Geschmack des Pfefferröhrlings (*Chalciporus piperatus* (Bull.: Fr.) Bat.) verursacht, besitzt ebenfalls eine polyenähnliche Struktur.^[62] Durch umfangreiche Verfütterungsexperimente konnte nachgewiesen werden, daß sich auch Chalciporon (**72**) biosynthetisch aus Bausteinen des Polyketidweges und einer Aminosäure zusammensetzt.^[63]

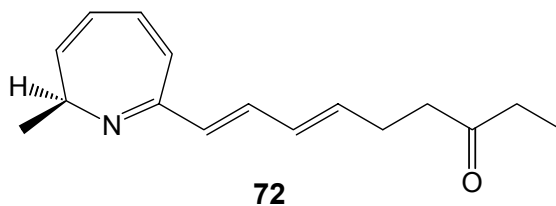


Abbildung 23: Struktur von Chalciporon (**72**)

3 SPEZIELLER TEIL

3.1 Der Porphyrröhrling (*Porphyrellus pseudoscaber* (Secr.) Singer)

3.1.1 Der Pilz



Abbildung 24: *Porphyrellus pseudoscaber*^[64]

Der Düstere Röhrling oder Porphyrröhrling (*Porphyrellus pseudoscaber* (Secr.) Singer, *Tylopilus pseudoscaber* Secr. ex Smith & Thiers, *Boletus porphyrosporus* Fries) wächst einzeln oder zerstreut von Juni bis Oktober in den Wäldern Europas und Nordamerikas. Der Hut ist zunächst halbkugelförmig, später leicht gewölbt, zwischen 5 und 12 cm groß. Die fein samtig-filzige Oberfläche ist graubraun bis schwärzlichbraun. Bei jungen Pilzen ist der Rand eingebogen, dann überstehend.

Die Röhren und Poren sind grau, später graubraun oder dunkelbraun, die Sporen rotbraun gefärbt. Der samtige oder faserige Stiel ist 6 bis 15 cm lang, zwischen 10 und 35 mm dick, zylindrisch und verjüngt sich nach oben hin leicht. Die Oberfläche des Stiels ist dunkelbraun und an der Basis oft weißfilzig. Das Fleisch ist fest und weiß oder weißgrau, mit unspezifischem, etwas bitterem Geschmack und unangenehmen Geruch. Bei Verletzung verfärbt sich der gesamte Pilz oft rötlich, bläulich, grünlich oder auch schwarzbraun. Der austretende Saft färbt Papier grün oder grünblau.^[12,65]

Manche Autoren unterscheiden zwischen einer dunkelbraunen Laub- und Mischwaldform, dem Blauenden Porphyrröhrling (*P. porphyrosporus* (Fr. & Hök) Gilbert), der sich durch bläulich-grüne Anlauffarben von der helleren, eher graubräunlichen Nadelwaldform, dem Düsteren Porphyrröhrling (*P. pseudoscaber* (Sect.) Singer), durch bräunlich-rote Verfärbungen des Fleisches unterscheidet. Umfangreiche systematische Untersuchungen von Kriegelsteiner zeigten jedoch, daß *P. porphyrosporus* und *P. pseudoscaber* nicht voneinander zu trennen sind, so daß beide Bezeichnungen synonym verwendet werden.^[66,67,68]

3.1.2 Bisherige Erkenntnisse

Da der Porphyrröhrling ähnliche Anlauffarben zeigt, wie der ihm oft nahe gestellte *Strobilomyces floccopus* (Vahl.: Fr.) Karst., wurde dieser bereits auf das Vorkommen von L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) untersucht. Es konnte jedoch kein L-DOPA in *Porphyrellus pseudoscaber* detektiert werden.^[69]

Mehrmals wurde bereits vergeblich versucht, die Verbindung zu isolieren, die die Ursache für die Blaufärbung ist. Die Farbstoffe aus dem Porphyrröhrling konnten bisher noch nicht bestimmt werden.

3.1.3 Isolierung und Untersuchung der Inhaltsstoffe

Im Rahmen dieser Arbeit werden blaufärbende Exemplare von *P. pseudoscaber* untersucht. Da in der Literatur schon vielfach Farbreaktionen des *P. pseudoscaber* mit verschiedenen Chemikalien beschrieben wurden^[70], werden diese Reaktionen an frischem Pilzmaterial durchgeführt, jeweils separat auf der Hutoberfläche, an Röhren und Fleisch des Pilzes.

Die verschiedenen Farbreaktionen sind in der folgenden Übersicht zusammengestellt:

Tabelle 1: Übersicht der Farbreaktionen bei *Porphyrellus pseudoscaber*

Reagenz	Huthaut	Röhren	Fleisch
H ₂ SO ₄ konz.	rötlich-orange	orange	keine Reaktion
HCl	orange	orange	keine Reaktion
KOH	orange	orange	braun-orange
NH ₃	orange bis grauviolett	keine Reaktion	violett- bis grüngrau
FeCl ₃	keine Reaktion	keine Reaktion	keine Reaktion
K ₃ [Fe(CN) ₆]	keine Reaktion	keine Reaktion	keine Reaktion

Aufgrund der unterschiedlichen Farbreaktionen werden von einem einzelnen Pilz Huthaut, Außenhaut, Schwamm und Fleisch jeweils getrennt unter Schutzgas in leicht salzsaurem Aceton eine Stunde lang extrahiert. Nach Abfiltrieren und Entfernen des Lösungsmittels wird der jeweilige Rückstand zwischen Wasser und Essigsäureethylester verteilt. Die erhaltenen organischen und wäßrigen Phasen werden eingengt und mittels analytischer HPLC untersucht.

Die HPL-Chromatogramme der organischen Extrakte von Stiel- und Huthaut enthalten eine farbige Verbindung, die zunächst **pp16** genannt wird und bei 409 nm ein Absorptionsmaximum besitzt. In den wäßrigen Phasen ist diese Verbindung nur in geringem Maße vorhanden, in den Extrakten des Pilzfleisches fehlt sie ganz.

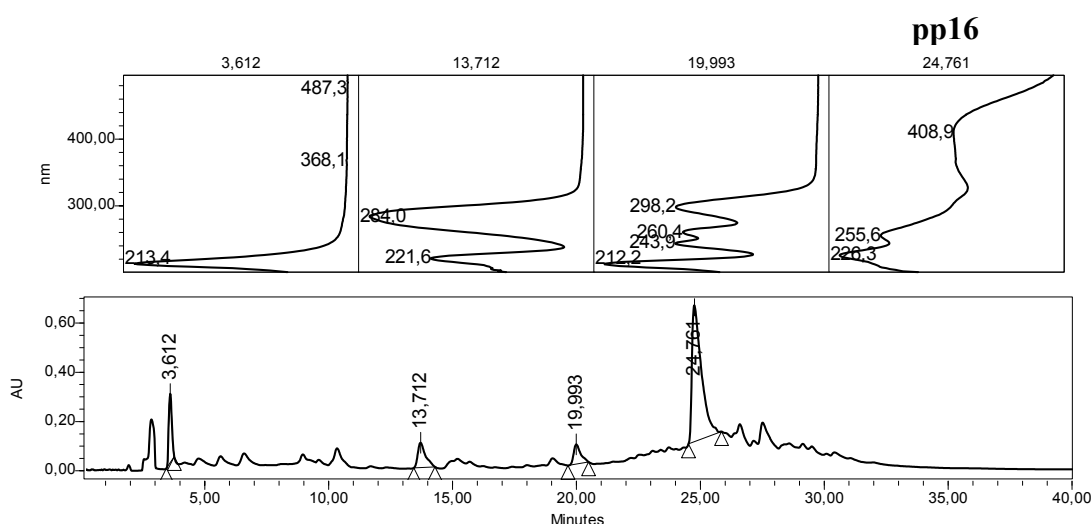


Abbildung 25: HPL-Chromatogramm der Huthaut von *P. pseudoscaber*

Für die weitere Aufarbeitung werden die frischen Pilze geschält und die Haut zusammen mit dem Schwammgewebe in Aceton, unter Zusatz von etwas Ascorbin- und Salzsäure, unter Schutzgasatmosphäre extrahiert. Die Lösung färbt sich sofort kräftig orange. Die Extraktion wird solange wiederholt, bis auch nach längerem Schütteln nur noch eine schwache Gelbfärbung auftritt. Das Aceton wird im Vakuum entfernt und die verbleibende, wäßrige Lösung mehrmals gegen Ethylacetat ausgeschüttelt. Die immer noch kräftig gefärbte Wasserphase wird anschließend mit n-Butanol erschöpfend extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und vom Lösungsmittel befreit. Man erhält einen rötlich-braunen Rückstand, dessen dünnschichtchromatographische Untersuchung neben **pp16** zwei weitere Pigmente mit nahezu identischen R_f -Werten zeigt.

Bei Detektion mit Ammoniakdampf färbt sich die Hauptverbindung **pp16** violett, die beiden Nebenverbindungen orange und grün.

Der Rückstand wird in Methanol gelöst und an Sephadex[®] LH 20 mit Methanol als Eluenten aufgetrennt. Die erste, braune Bande enthält eine Vielzahl polarer Verbindungen, vermutlich Oxidationsprodukte. Ihr folgt eine orange, immer mehr ins rötliche gehende Bande, die den Hauptinhaltsstoff **pp16** in steigender Konzentration enthält. Die beiden Nebepigmente sind nicht mehr zu detektieren. Die letzte, blaßgelbe Zone besteht vor allem aus Ergosterol und anderen unpolaren Verbindungen. Nach erneuter Trennung an Sephadex[®] LH 20 wird die farbige Fraktion über eine RP 18-Kartusche filtriert und mittels präparativer HPLC an RP 18 gereinigt.

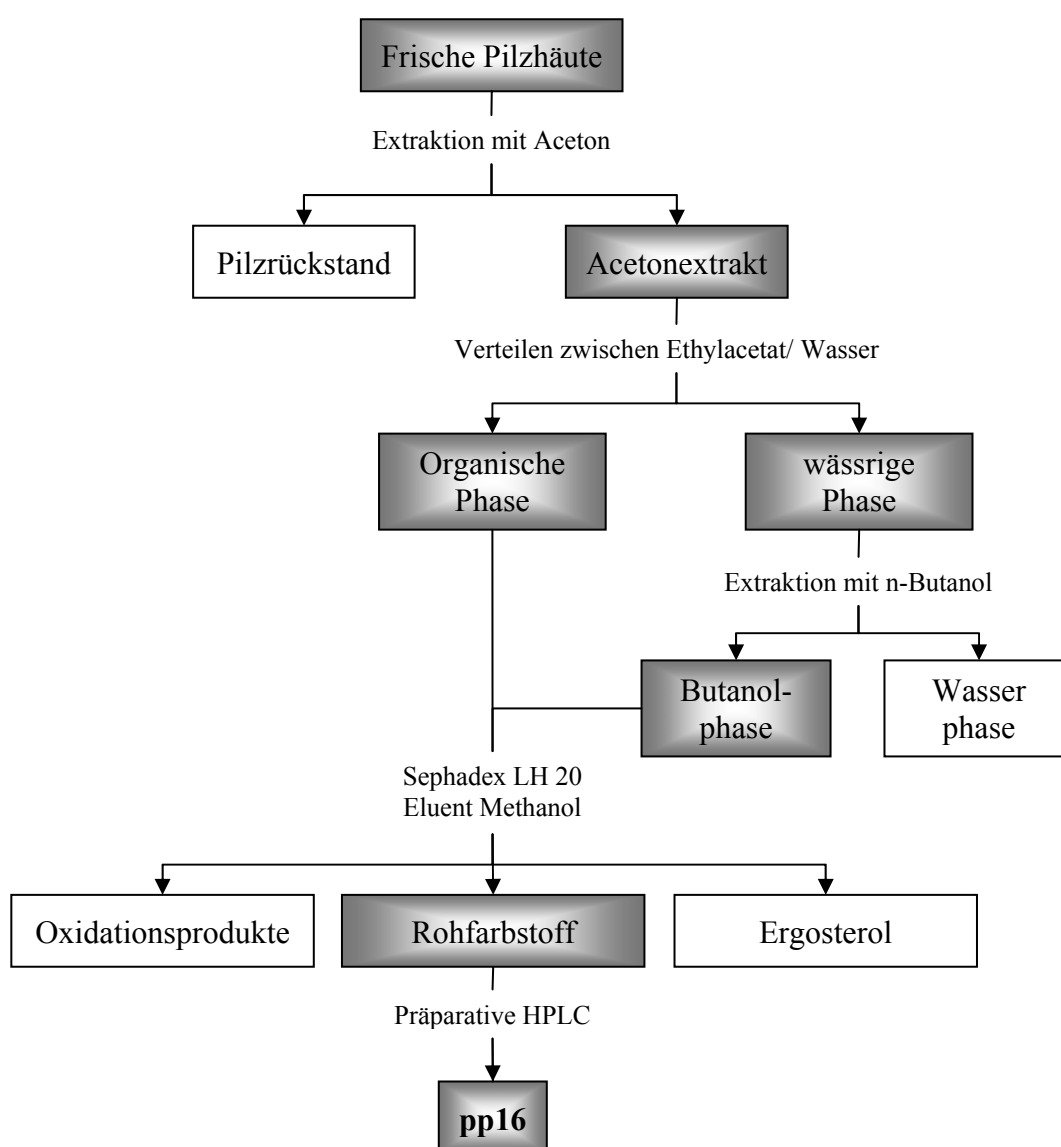


Abbildung 26: Isolierung von **pp16** aus *P. pseudoscaber*

3.1.4 Strukturaufklärung

Die Verbindung ist auch nach Reinigung nur in polaren Lösungsmitteln wie Methanol oder DMSO gut löslich. Im UV/VIS-Absorptionsspektrum erkennt man neben Absorptionsmaxima bei λ_{max} 226, 258 und 364 nm eine Schulter bei einer Wellenlänge von λ 422 nm, was die rotorange Farbe bereits vermuten lässt. Im stark Alkalischen zeigt **pp16** einen bathochromen Shift zu 498 nm, entsprechend der Violettfärbung mit Ammoniak.

Das IR-Spektrum zeigt, neben der OH-Valenzschwingung bei 3436 cm^{-1} , mehrere Banden der CO- und CC-Doppelbindungsvalenzschwingungen bei 1736 , 1567 und 1514 cm^{-1} . Die Banden bei 1464 , 1398 , 1233 , 1176 und 1060 cm^{-1} werden durch Valenzschwingungen von CO-Einfachbindungen und OH-Deformationsschwingungen verursacht.

Der hochaufgelöste Molekülpeak bei m/z 649 $[\text{M}-\text{H}]^-$ des (-)-ESI-Massenspektrum hat eine Zusammensetzung von $\text{C}_{34}\text{H}_{17}\text{O}_{14}$.

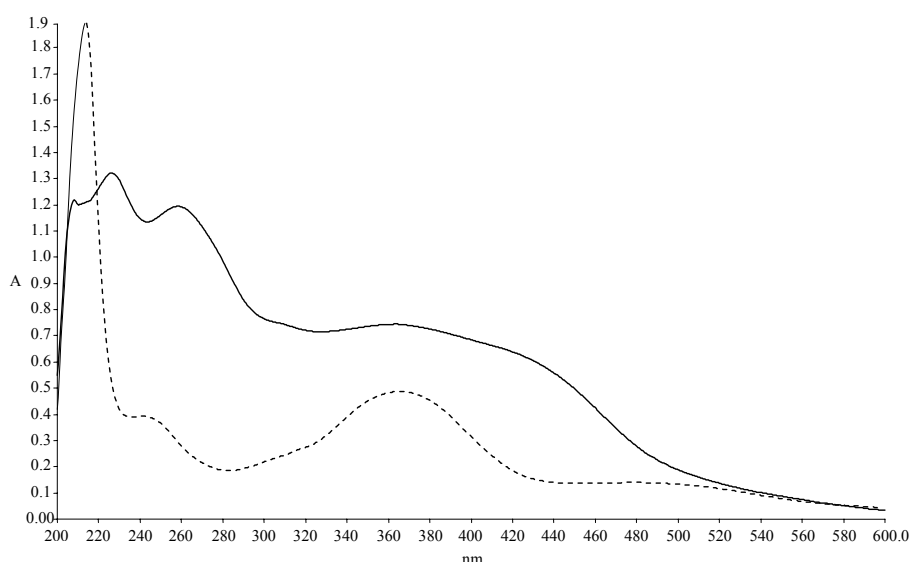


Abbildung 27: UV/VIS-Absorptionsspektren bei pH 7 (—) und pH 13 (---)

Das ^1H -NMR-Spektrum weist auf 12 aromatische Protonen hin. Darüberhinaus sind die Signale zweier Hydroxygruppen bei δ_{H} 9.53 und 9.56 zu sehen. Die Dubletts bei δ_{H} 7.05 und 6.73 bzw. δ_{H} 7.08 und 6.76 entsprechen jeweils zwei Protonen und können anhand des HMQC-Spektrums zwei parasubstituierten aromatischen Systemen zugeordnet werden. Von den verbleibenden vier Protonen erscheinen drei bei tiefem Feld bei δ_{H} 7.90, 8.32 und 8.52. Aus den Kopplungen des ^1H - ^1H -COSY-Spektrums ist zu entnehmen, daß sie Teil eines ABX-Spinsystems sind. Die Korrelationen des HMBC-Experimentes zeigen die Verbindung dieses aromatischen Systems mit dem verbleibenden Proton bei δ_{H} 6.44. Aufgrund der Farbreaktion

mit Ammoniak wird vermutet, daß es sich bei der Verbindung aus *P. pseudoscaber* um Bisnorbadiochinon A (**31**), ein Derivat des Badions A (**29**) handeln könnte.

Dies wird durch die ermittelten Teilstrukturen, die massenspektrometrische Untersuchung und den Vergleich mit Literaturdaten bestätigt.^[39] Die Tieffeldverschiebung der Protonen im Naphthochinonsystem kommt zum einen durch die Entschirmung der benachbarten Carbonylgruppen, zum anderen durch den coplanaren Pulvinsäurerest zustande.

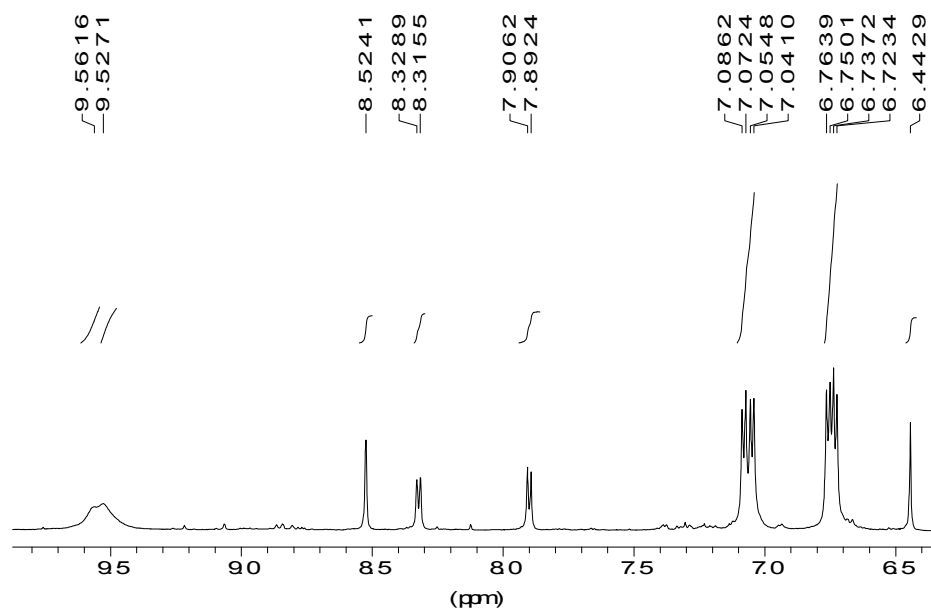


Abbildung 28: ^1H -NMR-Spektrum von **pp16** (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$)

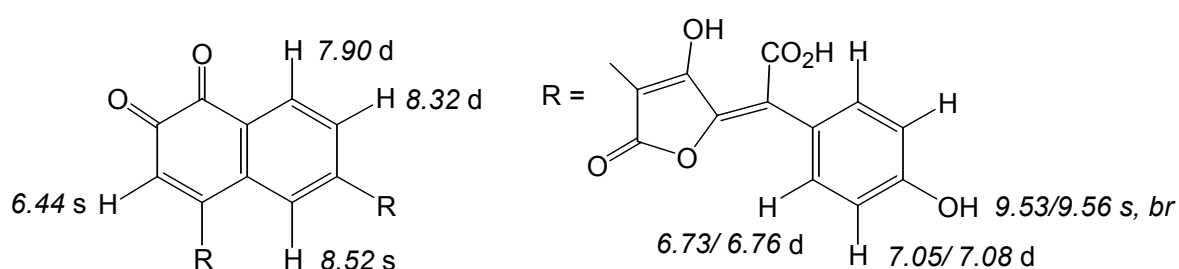


Abbildung 29: Struktur und ausgewählte ^1H -NMR-Verschiebungen von **31**

3.1.5 Beurteilung des Ergebnisses

Das Vorkommen von Bisnorbadiochinon A (**31**) überrascht, da noch keine Pulvinsäuren in *Porphyrellus pseudoscaber* detektiert werden konnten. Zudem wurde **31** bisher nur in geringen Mengen als Abbauprodukt von Badion A (**29**) aus dem Maronenröhrling isoliert.^[39]

3.1.6 Weitere Farbstoffisolierungen

Um die beiden nur in Spuren vorliegenden Nebenverbindungen zu identifizieren, die nach wiederholter Säulenchromatographie nicht mehr zu detektieren sind, wird eine alternative Aufarbeitung durchgeführt.

Dazu wird von frischen Pilzen die Stiel- und die Huthaut mit Aceton und etwas Ascorbinsäure 30 min extrahiert. Der orangefarbene Extrakt wird stark eingeeengt, mit etwas Methanol versetzt und nach Festphasenextraktion unverzüglich mittels präparativer HPLC an RP 18 getrennt.

Man erhält drei Fraktionen, die durch Coinjektion, Dünnschichtchromatographie und ^1H -NMR-Messungen identifiziert werden. Die Farbreaktion mit Ammoniak nach grün und orange läßt vermuten, daß es sich um die strukturell dem Bisnorbadiochinon (**31**) sehr ähnlichen Pigmente Badion A (**29**) und Norbadion A (**30**) handelt.

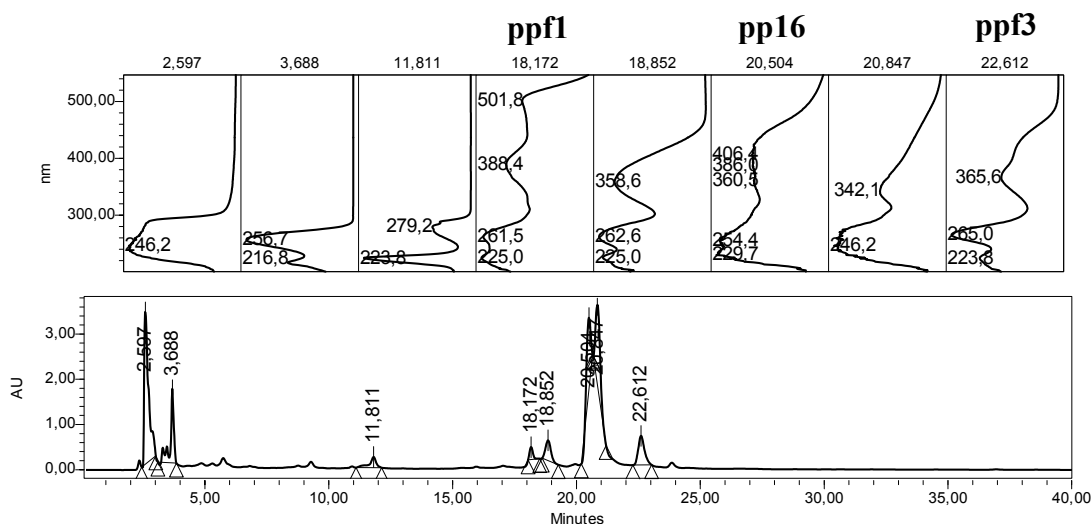


Abbildung 30: HPL-Chromatogramm des Extraktes von *Porphyrellus pseudoscaber*

Das UV/VIS-Absorptionsspektrum der ersten Verbindung ist mit dem von Badion A (**29**) identisch. Da jedoch für NMR-Messungen nicht ausreichend Substanz isoliert werden konnte, wird eine Coinjektion durchgeführt, die für die Verbindung **ppf1** aus *P. pseudoscaber* und Badion A (**29**) identische Retentionszeiten zeigt.

Der Farbstoff **ppf3** weist neben gleichem R_f -Wert auch dieselbe Retentionszeit sowie Farbreaktion wie Norbadion A (**30**) auf.

Im ^1H -NMR-Spektrum sind außer den acht Protonen der beiden Xerocomsäurereste auch die drei Singuletts der Naphtholacton-Protonen bei δ_{H} 7.44, 9.06 und 9.15 zu sehen. Es handelt sich bei der Verbindung **ppf3** um Norbadion A (**30**), das erstmals als Nebenpigment aus *Xerocomus badius* isoliert werden konnte.^[39]

Das Hauptpigment ist identisch mit Bisnorbadiochinon A (**31**), es wird zusätzlich zum Protonenspektrum auch durch Coinjektion und vergleichende Dünnschichtchromatographie identifiziert.

Die Verbindung, die die blaue Farbreaktion bei Verletzung des Pilzes verursacht, kann nicht detektiert werden. Vermutlich handelt es sich um eine äußerst oxidationsempfindliche Substanz, die unter normalen Bedingungen nicht isoliert werden kann. Die von Bresinsky und Besl beschriebene gelbe Verbindung aus amerikanischen Exemplaren ist in der europäischen Spezies nicht enthalten.^[18]

3.1.7 Untersuchung von amerikanischem Material

Von einer Kollektion aus dem Osten der USA wird ein Extrakt in der beschriebenen Weise hergestellt und analytisch untersucht. Als einzige farbige Verbindung ist hier Bisnorbadiochinon A (**31**) enthalten, weitere Farbstoffe können nicht detektiert werden.

3.1.8 Probleme bei der Isolierung und Strukturaufklärung

Bei der Aufarbeitung kam es aufgrund der stark polaren Beschaffenheit dieser Verbindungen zu mehreren Problemen. Obwohl die Derivate des Badios als gut methanollöslich beschrieben werden^[39], lösen sie sich meist nur nach Säurezusatz vollständig, da durch Komplexbildung mit Kalium oder anderen Metallionen schwarze, schwerlösliche Niederschläge entstehen. Bei NMR-Messungen führt die Komplexierung trotz ausreichender Substanzmenge zu deutlich verlängerter Meßzeit und zur Verbreiterung der Signale.^[71]

Durch verschiedene Reinigungsversuche, wie Waschen mit EDTA-Lösung oder salzsaurem Wasser, kann keine Aufreinigung erzielt werden. Die in der Literatur beschriebenen Entsalzung durch Abfiltrieren des KCl-Niederschlags aus einer salzsauren Acetonlösung des Pigments^[42] oder Ionenaustauschchromatographie an stark saurem Kationentauscher wird wegen Substanzmangels nicht versucht.^[71]

3.1.9 Chemotaxonomische Beurteilung

Wiederholt wurde bereits versucht, den Pilz *Porphyrellus pseudoscaber* systematisch eindeutig einzuordnen. Während die dunkelbraune Färbung des Sporenpulvers für eine Zuordnung zu den *Strobilomycetaceae* spricht,^[72] stellt die glatte Oberfläche der Sporen wiederum eine nahe Beziehung zu den Gattungen *Tylopilus* und *Austroboletus* innerhalb der Subfamilie *Boletioideae* her. Zudem wurde mit der Abwesenheit von Pulvinsäuren als Beleg dieser taxonomischen Einteilung argumentiert.^[18,73]

Die synonyme Verwendung der Bezeichnungen *Tylopilus* und *Porphyrellus* im amerikanischen und neuseeländischen Raum erschweren zudem die Differenzierung.^[74]

Neuere Arbeiten auf molekularbiologischer Basis zeigen jedoch eine deutliche Abgrenzung der Gattung *Porphyrellus* von *Tylopilus* und *Austroboletus*, vielmehr wird eine Einordnung in die Familie der *Strobilomycetaceae* postuliert.^[74] Pigmentchemisch ist diese Zuordnung jedoch nicht zu belegen, da die für *Strobilomycetaceae* typischen Verbindungen L-DOPA und die daraus entstehenden Melanine nicht vorhanden sind. Vielmehr spricht das Vorkommen der dimeren Pulvinsäurederivate **29**, **30** und **31** für eine nähere Beziehung zu den *Boletaceae*. Die größte Artenvielfalt der *Strobilomycetaceae* findet man in Afrika und Südostasien. Eine chemische und molekularbiologische Untersuchung mehrerer Arten von dort könnte vielleicht noch offene Fragen beantworten und wichtige Lücken innerhalb dieser Familien schließen.

3.2 *Xanthoconium affine* (Peck) Singer

3.2.1 Pilzbeschreibung



Abbildung 31: *Xanthoconium affine* ^[75]

Der Pilz *Xanthoconium affine* (Peck) Singer (= *Boletus affinis* Peck) ist in den Hartholzwäldern im Osten Nordamerikas in regenreichen Sommern häufig anzutreffen.

Er wächst gesellig oder zerstreut bevorzugt auf kleinen Lichtungen. Der Hut ist anfangs runzelig, später fast glatt und flach, seine Größe liegt zwischen 5 und 11 cm. Die trockene, bei Regen klebrige Huthaut reißt vor allem bei älteren Exemplaren feldrig auf. Die Farbe des Hutes variiert von gelbbraun über hell-kastanienbraun bis ockerfarben. Die Röhren des jungen Pilzes sind weiß, später gelb- oder zimtbraun, die gleichfarbigen, kleinen, fast runden Poren färben bei Druck leicht gelb. Das Sporenpulver ist gelb, dann hellbraun bis rostbraun und färbt mit KOH kräftig goldgelb. Der schwammige Stiel ist zylindrisch, manchmal etwas abgeflacht, zwischen 4 und 8 cm lang, bis zu 3.5 cm dick und bei älteren Exemplaren meist hohl. Er ist weiß oder blaß ockerbraun gestreift, die Spitze kann genetzt, faltig oder rötlichbraun gebändert sein. Das schwammige, weiße Fleisch bläut nicht und besitzt einen mehligem, leicht süßlichen Geruch und Geschmack. Um Fraßgänge von Insektenlarven tritt meist eine kräftig gelbe Färbung auf.^[76,77]

Die von Peck beschriebenen getupften Exemplare, die er als die Varietät *maculosus* bezeichnet, unterscheiden sich nur in wenigen Merkmalen.^[76]

Der Hut bleibt oft gewölbt, die Huthaut ist rau, dunkelgelbbraun bis ockerfarben und mehr oder weniger blaßgelb gepunktet. Die Röhren alter Pilze sind gelb mit runden Poren. Der feste, meist genetzte Stiel kann gebaucht oder an der Basis etwas verdickt sein.^[76]

3.2.2 Bisherige Arbeiten

Aufgrund der beschriebenen Farbveränderungen bei Insektenbefall wurde der Pilz bereits mehrmals im Rahmen systematischer Arbeiten auf seine Inhaltsstoffe hin untersucht, es konnten jedoch keine bekannten Pigmente nachgewiesen werden.^[18]

3.2.3 Isolierung der Farbstoffe

Von einem einzelnen Pilz werden Huthaut, Röhren und Stiel getrennt extrahiert. Die Untersuchung mittels analytischer HPLC zeigt, daß nur der Extrakt der Huthaut farbige Verbindungen enthält. Für die weitere Aufarbeitung wird die Haut von den Pilzhüten abgetrennt, zermahlen und mehrmals mit Aceton, unter Zusatz von verdünnter Salzsäure und Ascorbinsäure extrahiert. Der kräftig orangefarbene Extrakt wird eingeeengt, mit Wasser versetzt und mehrmals gegen Ethylacetat ausgeschüttelt, dabei bleibt die Wasserphase hellgelb. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat werden die organischen Extrakte durch Festphasenextraktion gereinigt und mittels analytischer HPLC an RP 18 untersucht.

Da das Chromatogramm nur wenige Substanzen mit deutlich unterschiedlichen Retentionszeiten zeigt, wird direkt mittels präparativer und semipräparativer HPLC getrennt. Man erhält ein Hauptpigment **xar1** und die beiden Nebenzpigmente **xag1** und **xag3**.

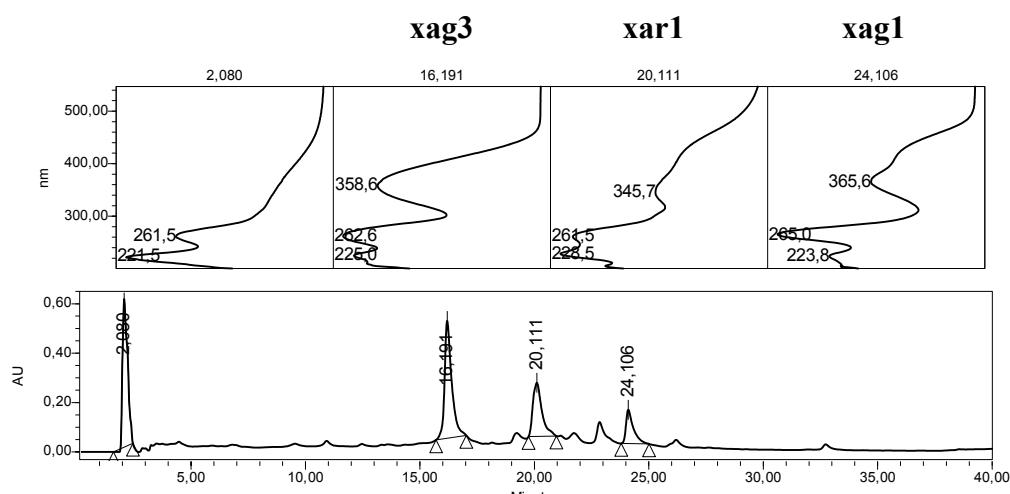


Abbildung 32: HPL-Chromatogramm des Rohextraktes von *X. affine*

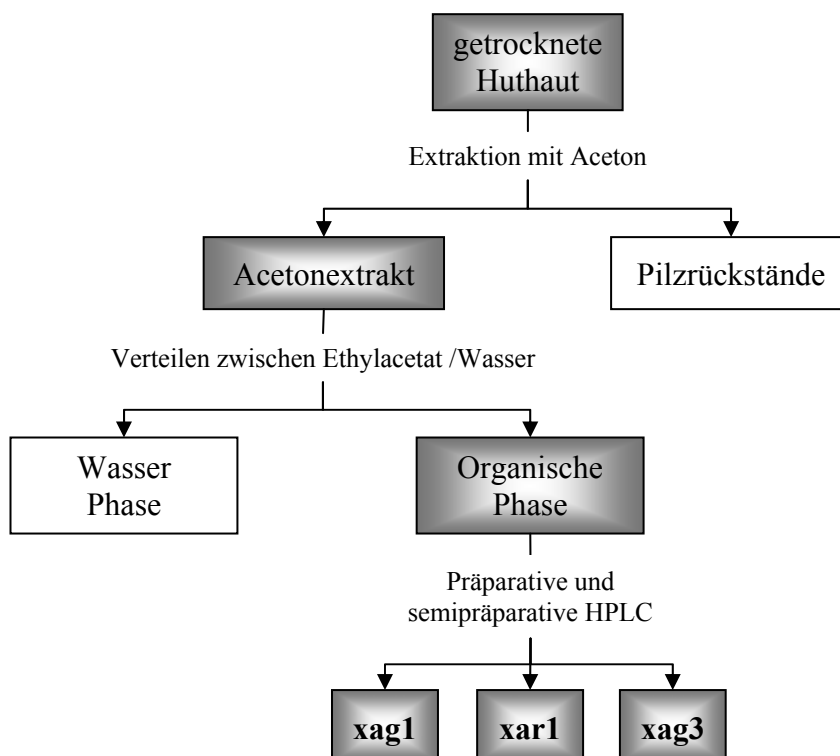


Abbildung 33: Isolierung der Farbstoffe aus *Xanthoconium affine*

3.2.4 Strukturaufklärung von xar1

Die Hauptinhaltsstoff **xar1** verfärbt sich im Ammoniakdampf grau violett. Dieses Verhalten ist typisch für Bisnorradiochinon A (**31**), welches bereits aus *Porphyrellus pseudoscaber* isoliert werden konnte.

Das ^1H -NMR-Spektrum zeigt, neben den Signalen der beiden Xerocomsäurereste, drei Signale bei tiefem Feld, δ_{H} 8.50, 8.34 und 7.92, die dem Naphthochinonsystem von **31** zugeordnet werden können. Das isolierte Proton des Chinonsystems erscheint als Singulett bei δ_{H} 6.46 und stimmt, ebenso wie die Verschiebungen der anderen Signale, mit den Literaturwerten des Bisnorradiochinons A (**31**) überein.^[39] Zudem bestätigt eine Coinjektion mit **31**, isoliert aus *P. pseudoscaber*, daß es sich um identische Verbindungen handelt.

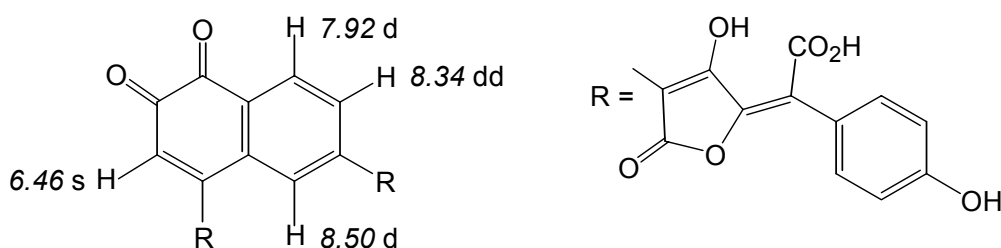


Abbildung 34: Ausgewählte Verschiebungen δ_{H} und Struktur von **31**

3.2.5 Struktur von xag1

Die dritte Fraktion ist kräftig zitronengelb, beim Entfernen des Lösungsmittels fällt der Farbstoff in orangefarbenen Flocken aus. Im Ammoniakdampf zeigt **xag1** die gleiche Reaktion wie Norbadion A (**30**).

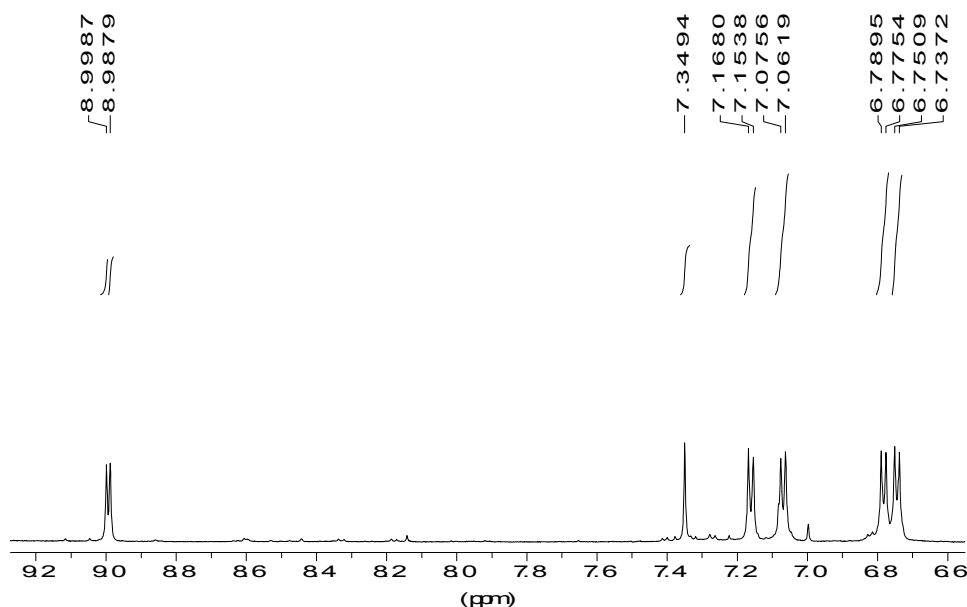


Abbildung 35: ^1H -NMR-Spektrum von **xag1** (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$)

Die Auswertung der NMR-Spektren bestätigt die Vermutung, daß es sich bei der aus *X. affine* isolierten Verbindung um Norbadion A (**30**) handelt. Man sieht im Protonenspektrum Signale für elf aromatische Protonen, von denen zwei deutlich tieffeldverschoben sind. Sie erscheinen als Singulett mit dem Integral für je ein Proton bei δ_{H} 9.00 und 8.99. Zusammen mit dem Singulett bei δ_{H} 7.35 kann man unter Einbeziehung der gekoppelten Spektren und des ^{13}C -Experiments das Naphtholactonsystem des Norbadions ermitteln. Die Signale der beiden para-hydroxysubstituierten Aromaten erscheinen als Dubletts bei δ_{H} 6.75 und 7.07 bzw. bei δ_{H} 6.79 und 7.16, jeweils mit dem Integral für zwei Protonen.

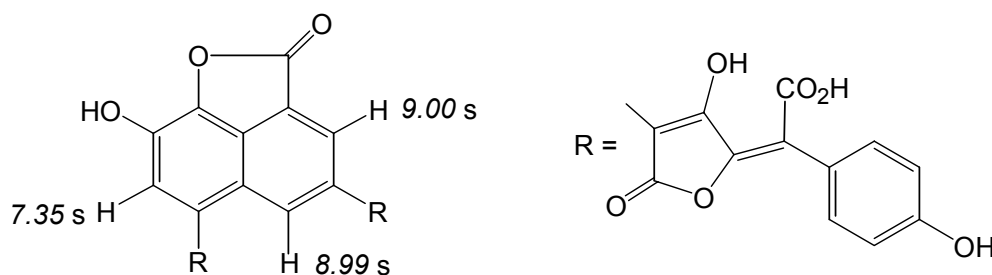


Abbildung 36: Struktur und ausgewählte Verschiebungen δ_{H} von **30**

3.2.6 Identifizierung von **xag3**

Den geringsten Anteil am Extrakt hat **xag3**. Die gelbe Substanz besitzt auf Kieselgel einen R_f -Wert von 0.46 und zeigt mit Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung keine Farbreaktion. Das UV/VIS-Spektrum des HPL-Chromatogrammes zeigt das typische Absorptionsspektrum einer Pulvinsäure, zwei Absorptionsmaxima bei 225 und 263 nm und ein relatives Maximum bei 359 nm. Es kann kein aussagekräftiges Massenspektrum der Verbindung erhalten werden. Aus der dünnschichtchromatographischen Untersuchung kann man entnehmen, daß es sich um Atromentinsäure (**14**) handelt, was auch mit dem Signalmuster des Protonenspektrums vereinbar ist. Es sind vier Dubletts bei δ_H 6.72, 6.74, 7.04 und 7.07 zu sehen, von denen jeweils zwei miteinander korrelieren. Alle Signale entsprechen jeweils zwei Protonen.

3.2.7 Chemotaxonomische Interpretation der Ergebnisse

Die Gattung *Xanthoconium* mit ihrem einzigen Vertreter *Xanthoconium affine* wurde bisher aufgrund ihrer äußeren Merkmale und fehlender Pulvinsäuren von der Gattung *Boletus* getrennt. Auch die molekularbiologischen Ergebnisse sprechen für die Aufrechterhaltung einer eigenen Gattung.^[74]

Der Nachweis typischer Boletales-Pigmente, wie Bisnorbadiochinon (**31**), Norbadion (**30**) und Atromentinsäure (**14**), ist jedoch ein Hinweis auf die nahe Beziehung zu *Boletus*.

3.2.8 Zur Problematik der Badionderivate

Obwohl Badion A und dessen Derivate schon vielfach beschrieben wurden, genügt allein der Vergleich von R_f -Werten und 1H -NMR-Werten mit Literaturdaten nicht, da es durch starke Komplexbildung von Metallionen zu einer deutlichen Verschiebung der Signale kommt.

Die starke Tendenz zur Komplexbildung bringt schon bei der Extraktion der Farbstoffe Probleme mit sich, da die Verbindungen im getrockneten Pilz nur unter Säurezusatz in Lösung gehen.

Zur sicheren Identifizierung ist meist der dünnschichtchromatographische Vergleich mit authentischem Material, insbesondere die Farbreaktion im Ammoniakdampf, eine Coinjektion an der HPLC und die Aufnahme von zweidimensionalen Spektren nötig.

3.3 *Boletus erythropus* (Fr.) Pers.

3.3.1 Beschreibung des Pilzes

Der Flockenstielige Hexenröhrling (*Boletus erythropus* (Fr.) Pers.) (auch *Boletus queletii* Schulzer) wächst von Mai bis September im Laub- und Nadelwald auf kalkfreien, sauren Böden. Der dickfleischige Hut ist beim jungen Pilz halbkugelförmig, später polsterförmig und schließlich flach. Er erreicht eine Größe von 5 bis 15 cm, die Huthaut ist feinfilzig, meist samtig dunkelbraun oder auch dunkelziegelrot gefärbt. Die Röhren sind jung gelblich oliv, dann orange bis blutrot gefärbt. Die Poren sind klein und bläuen, ebenso wie die Röhren, sofort bei Verletzung. Die Sporen sind olivbräunlich. Der bauchige, keulige, selten zylindrische Stiel ist gelb und mit roten Flocken besetzt, ein Netz fehlt hier. Auch das Fleisch bläut bei Druck oder Beschädigung, es ist sehr fest und mild im Geschmack.^[12,65]



Abbildung 37: Flockenstieller Hexenröhrling (*Boletus erythropus*)^[78]

3.3.2 Bisherige Erkenntnisse und Zielsetzung dieser Arbeit

Aufgrund seines stark blaufärbenden Fleisches war *Boletus erythropus* schon Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Dabei wurden die Hydroxypulvinsäuren Atromentinsäure (**14**), Variegatsäure (**17**), Xerocomsäure (**15**), und Variegatorubin (**18**) detektiert, letztere zunächst nur dünnschichtchromatographisch.^[16] Im Rahmen eines HPLC-Screenings konnte Schmidt neben diesen Verbindungen auch Atromentin (**6**) nachweisen. Bei der Untersuchung der Huthaut fielen Schmidt neben Badion B (**32**) zwei Nebenverbindungen mit sehr ähnlichen Retentionszeiten auf. Eine dieser Verbindungen zeigte ein mit Norbadion A (**30**) nahezu identisches UV/VIS-Absorptionsspektrum, was vermuten läßt, daß es sich um das analoge Norbadion B handeln könnte.^[20]

In dieser Arbeit sollen diese Nebenpigmente isoliert und ihre Struktur aufgeklärt werden.

3.3.3 Isolierung der Verbindungen aus der Huthaut

Um möglichst wenig Begleitsubstanzen zu isolieren, wird von frischen Pilzen die Huthaut abgezogen und getrocknet.^a Nach Einweichen in etwas Wasser werden diese mit salzsaurem Aceton und einer Spatelspitze Ascorbinsäure versetzt und bis zur Farblosigkeit extrahiert. Die tief orangebraunen Extrakte werden eingeeengt und der wässrige Rückstand mehrmals gegen Ethylacetat ausgeschüttelt. Um die polaren Farbstoffe gänzlich aus der Wasserphase zu entfernen, wird anschließend mit n-Butanol extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und über Sephadex[®] LH 20 mit Methanol als Eluenten aufgetrennt.

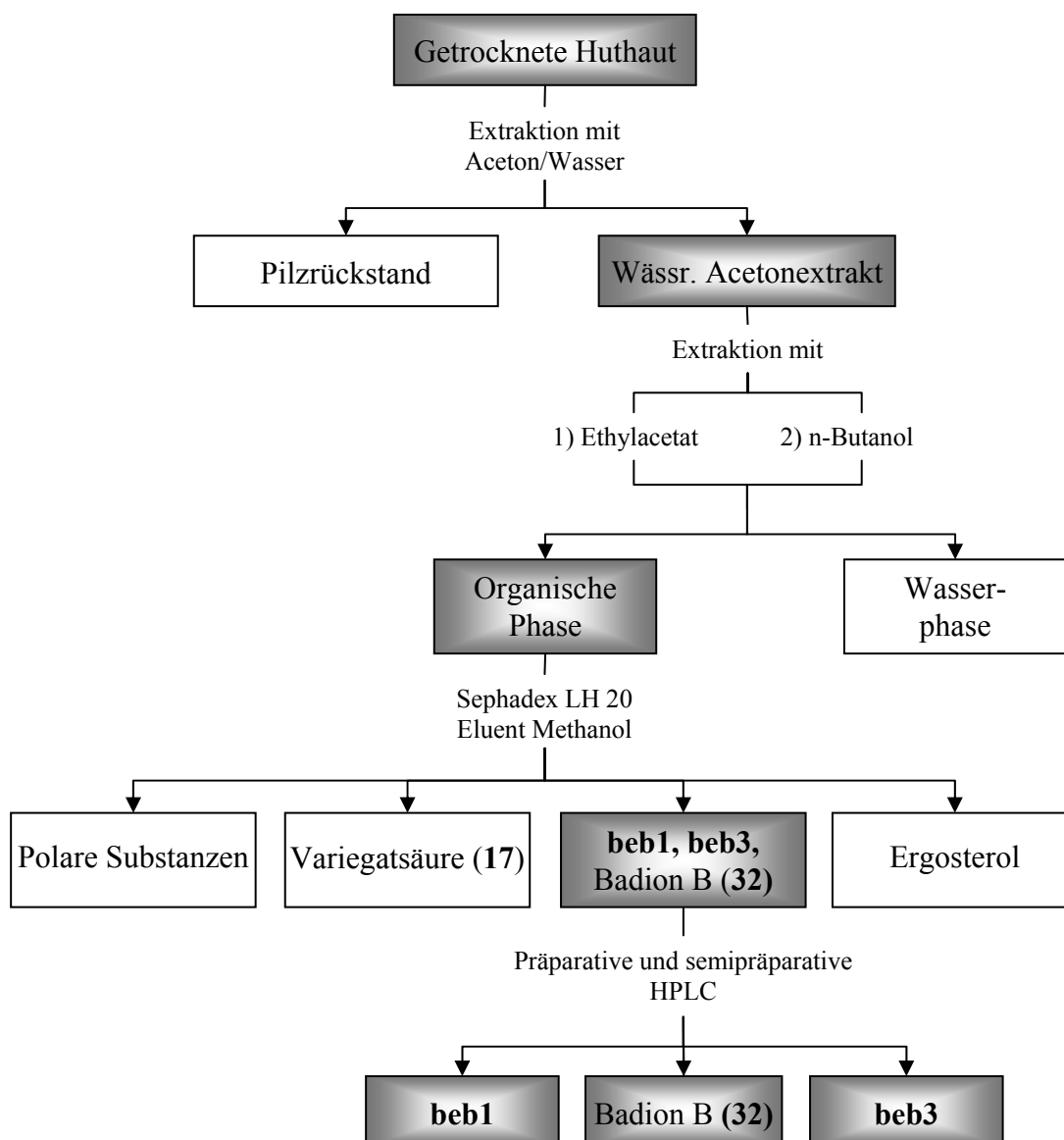


Abbildung 38: Isolierung der Farbstoffe aus der Huthaut von *B. erythropus*

^a Ich danke Familie Schultz für ihre freundliche Unterstützung und die Zusendung der Huthäute.

Man erhält vier Fraktionen, von denen die erste, bräunliche Bande vor allem sehr polare Verbindungen enthält und in eine leuchtend gelbe Zone übergeht, die aus Variegatsäure (**17**) besteht. Die folgende, kräftig orange und später rote Fraktion enthält neben Badion B (**32**) die beiden gesuchten Begleitsubstanzen. Als letztes wird Ergosterol zusammen mit anderen unpolaren Verbindungen von der Säule eluiert. Die weitere Trennung der gesuchten Farbstoffe erfolgt mittels präparativer und semipräparativer HPLC. Wahrscheinlich liegt eine große strukturelle Ähnlichkeit vor, da die Trennung durch fast identische Retentionszeiten erschwert wird.

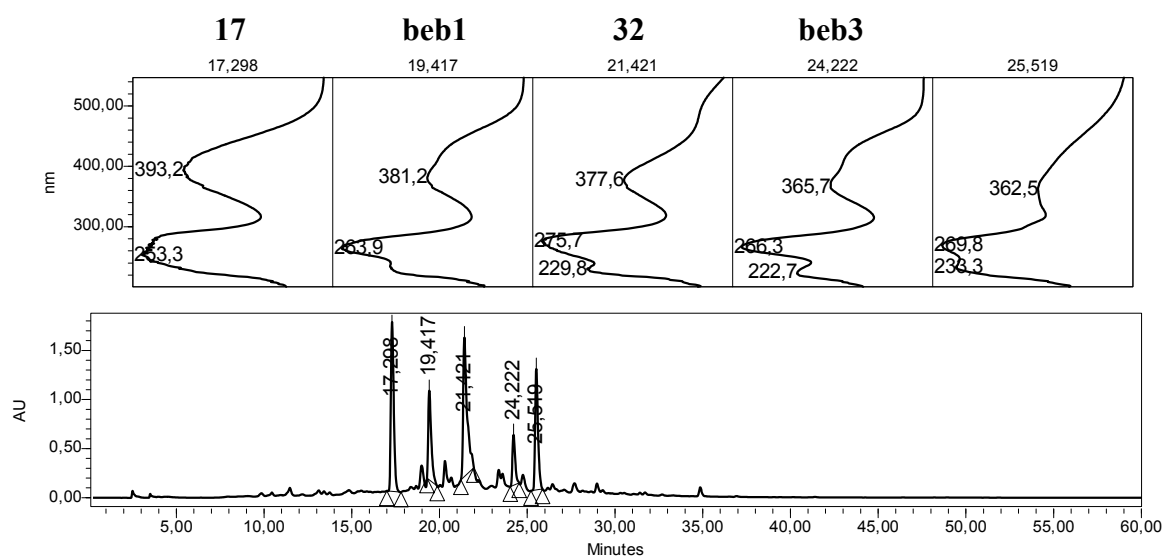


Abbildung 39: HPL-Chromatogramm des Rohextraktes von *B. erythropus*

3.3.4 Ein neues Badienderivat beb1

Die Verbindung mit geringerer Retentionszeit im Vergleich zu Badion B (**32**) weist ein dem Norbadion A (**30**) sehr ähnliches UV/VIS-Absorptionsspektrum auf, mit Absorptionsmaxima bei 208, 271 und 392 nm.

Das IR-Spektrum zeigt neben den intensiven Banden der OH-Valenzschwingungen bei 3401 und 3208 cm^{-1} auch eine starke Carbonylvalenzschwingung bei 1767 cm^{-1} . Die Banden bei 1283 und 1023 cm^{-1} sind auf Valenzschwingungen von CO-Einfachbindungen zurückzuführen. Zwei weitere Banden bei 1604 und 997 cm^{-1} geben Hinweis auf ungesättigte, aromatische Strukturen.

Von der Verbindung kann nur unter großen Schwierigkeiten^b ein Massenspektrum erhalten werden. Die Verbindung zeigt gegenüber **32** einen um 22 Masseneinheiten erhöhten Molekülpeak bei m/z 760.

Weitere intensive Signale sind bei m/z 498, 480 und 236 zu sehen. Diese Fragmentierung könnte sich folgendermaßen erklären: Nach Abspaltung eines Pulvinsäurebausteins wird der zweiten Pulvinsäurerest unter Wasserabspaltung lactonisiert bzw. ebenfalls abgespalten.

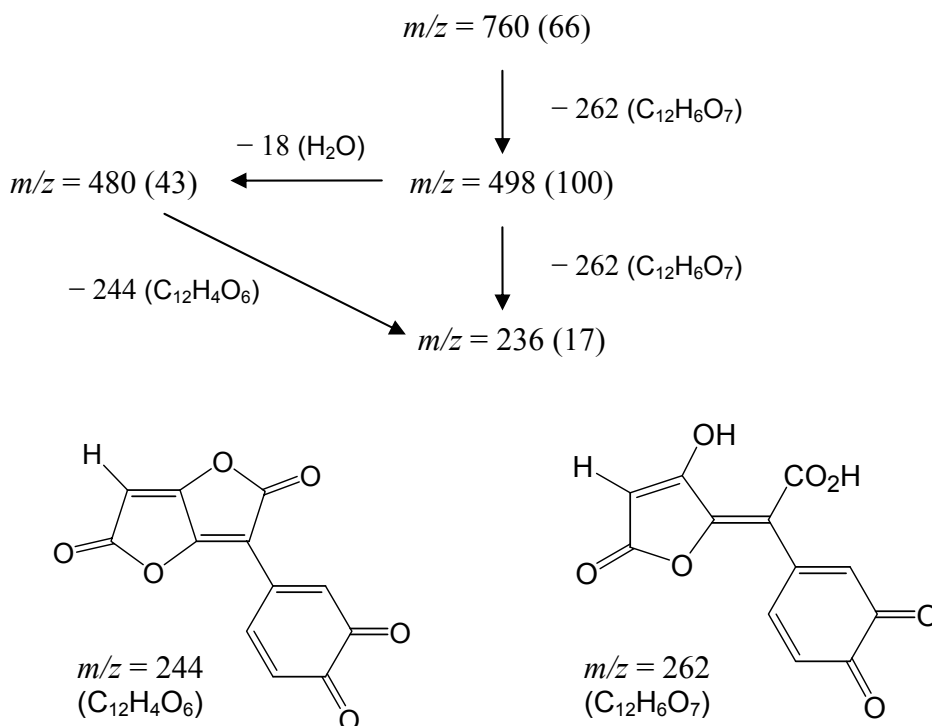


Abbildung 40: Mögliche Fragmentierung von **beb1** im ESI-MS

Im 1H -NMR-Spektrum erkennt man im Bereich von δ_H 6.51 bis 6.91 die Signale der beiden Dihydroxyphenylringe der Variegatsäurereste. Sie zeigen die typischen Kopplungen eines ABX-Spinsystems ($J = 1.6, 8.0$ bzw. $1.7, 8.3$ Hz). Neben einem Signal bei δ_H 7.17 und drei weiteren drei Singulets bei tiefem Feld sind noch drei Hydroxygruppen bei δ_H 7.01, 7.10 und 7.18 zu sehen.

Aus den gekoppelten HMBC und HMQC-Spektren geht hervor, daß die beiden Protonen bei δ_H 8.71 und 8.76 in *ortho*-Position zu einem Pulvinsäurerest stehen, da sie sowohl $^3J_{CH}$ -Kopplungen zu dem Kohlenstoff des Furanonringsystems bei δ_C 96.0 als auch Korrelationen zum jeweils anderen Methin-Kohlenstoff zeigen. Vermutlich liegt hier kein zu Badion B (**32**) analoges Naphtho-Pyrandion-System vor, da die typischen $^3J_{HH}$ -Korrelationen zwischen den

^b Ich danke Herrn Prof. M. Spiteller für die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen.

Naphthalin-Protonen fehlen und beide Signale nicht so stark tieffeldverschoben sind wie bei **32**. Auch eine *ortho*-chinoide Struktur wie in Bisnorbadiochinon A (**31**) oder Pischonon (**33**) ist auszuschließen, da kein Carbonylsignal im Bereich von δ_C 180 zu sehen ist. Das Proton bei δ_H 8.71 koppelt zudem zu einer Carbonylgruppe bei δ_C 168.8 und, ebenso wie das bei δ_H 8.76, zu einem Kohlenstoff bei δ_C 125.8. Dem zweiten Pulvinsäuresystem benachbart ist das aromatische Proton bei δ_H 7.17, welches auch zu den Signalen bei δ_C 123.3, 119.7 und 137.9 koppelt. Das scharfe Singulett bei δ_H 10.48 verschwindet bei Zugabe von D_2O und entspricht einer OH-Gruppe, welche durch eine Wasserstoffbrückenbindung fixiert ist. Neben Korrelationen zu den Signalen bei δ_C 119.7 und 125.7 zeigt die Hydroxygruppe auch Kopplungen zu der benachbarten Carbonylgruppe bei δ_C 168.6. Wegen Überlagerung mehrerer Carbonylsignale kann nicht genau bestimmt werden, ob es sich dabei um das Kohlenstoffatom handelt, zu dem auch das Proton bei δ_H 8.76 koppelt. Da weitere Korrelationssignale fehlen, kann keine Verbindung zwischen den Teilstücken geschaffen werden, zumal man davon ausgehen kann, daß nicht nur $^3J_{HH}$ -Kopplungen zu sehen sind.

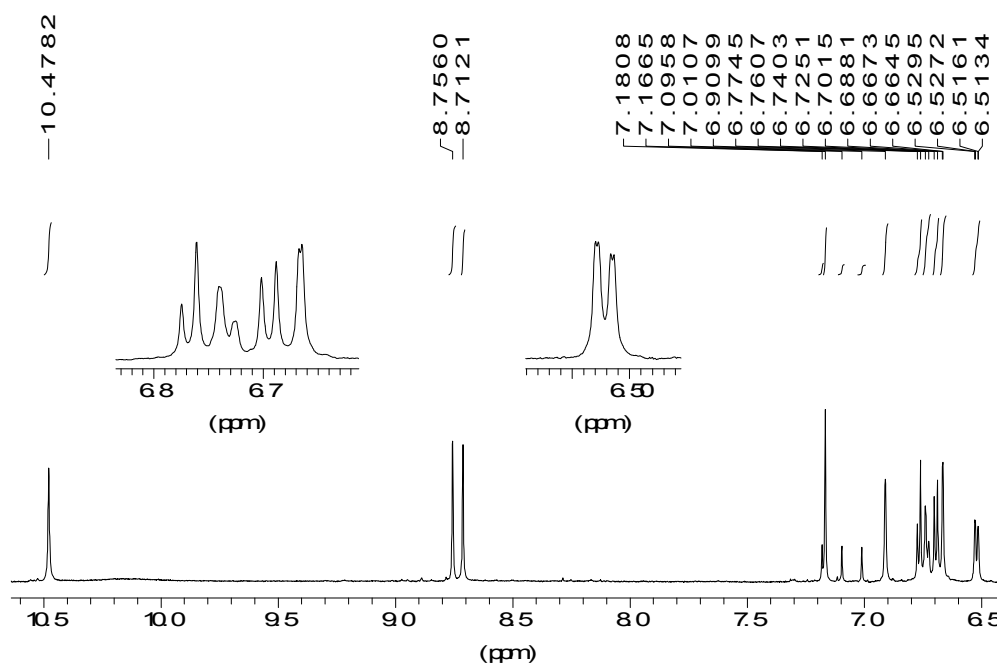


Abbildung 41: 1H -NMR-Spektrum von **beb1** (600 MHz, $[D_6]DMSO$)

Im ^{13}C -NMR-Spektrum sind Signale für 35 Kohlenstoffe zu sehen. Da jedoch kein hochaufgelöstes Massenspektrum erhalten werden konnte, läßt sich nicht ausschließen, daß weitere Kohlenstoffatome vorhanden sind. Nur mit Hilfe der Summenformel oder einer geeigneten Derivatisierung der funktionellen Gruppen des zentralen Ringsystems können die Daten der NMR-Experimente der richtigen Struktur zugeordnet werden.

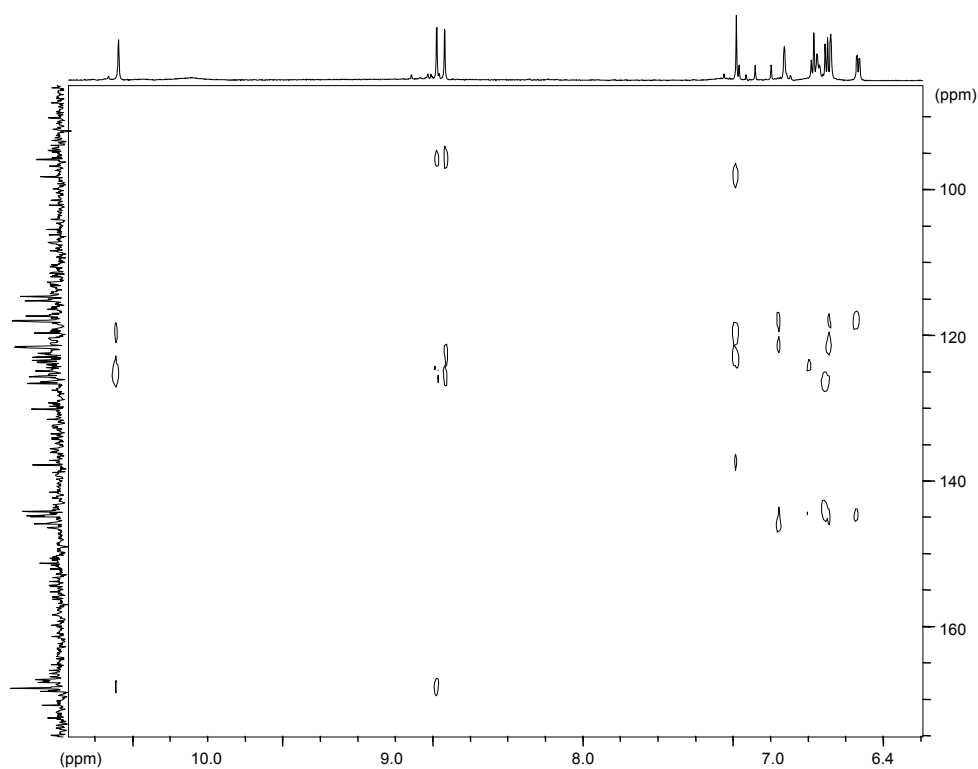


Abbildung 42: HMBC-Spektrum von **beb1** (600/150 MHz [D₆]DMSO)

Die ermittelten Teilstrukturen sind zusammen mit wichtigen Korrelationen und Verschiebungen δ_H in der folgenden Abbildung zusammengestellt.

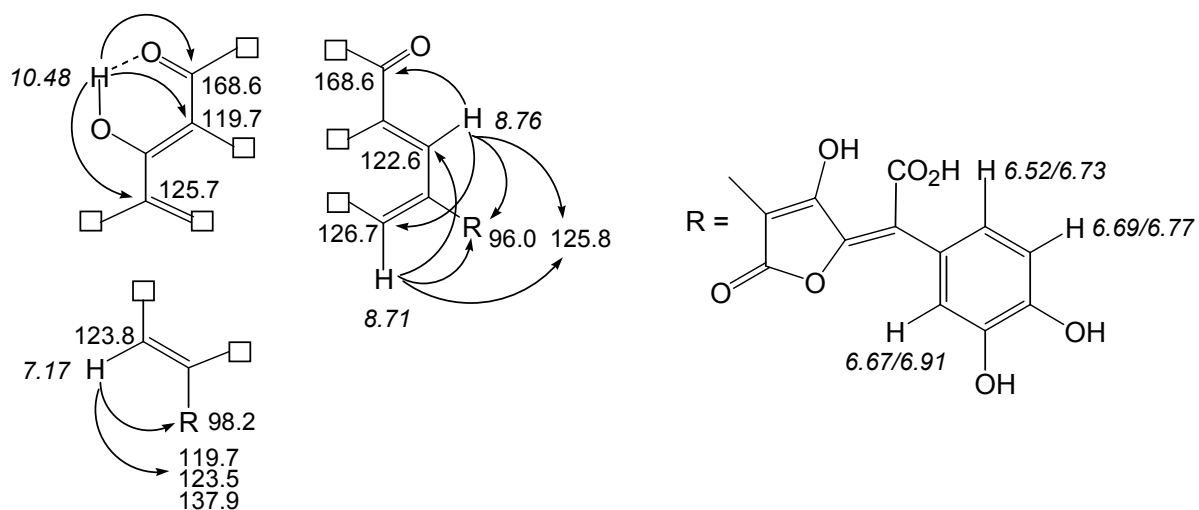


Abbildung 43: Ausgewählte HMBC-Korrelationen und NMR-Daten der Teilstrukturen

3.3.5 Vergleich mit ähnlichen Strukturen

Der Vergleich mit NMR-Daten von Badion A (**29**), Norbadion A (**30**), Bisnorbadiochinon A (**31**), Pischonin (**33**) und Aurantricholon (**73**) zeigt, daß die in **beb1** vorliegende Struktur viele Übereinstimmungen aufweist.^[39,41,42,79] Verbindungen mit *ortho*-chinoider Struktur können aufgrund der ¹³C-NMR-Daten ausgeschlossen werden. Möglicherweise besitzt **beb1** einen Siebenring, ähnlich dem Aurantricholon (**73**), da auch bei **73** die Protonen in 1,3-Position am Siebenring keine Kopplung zueinander zeigen und als Singulets erscheinen.

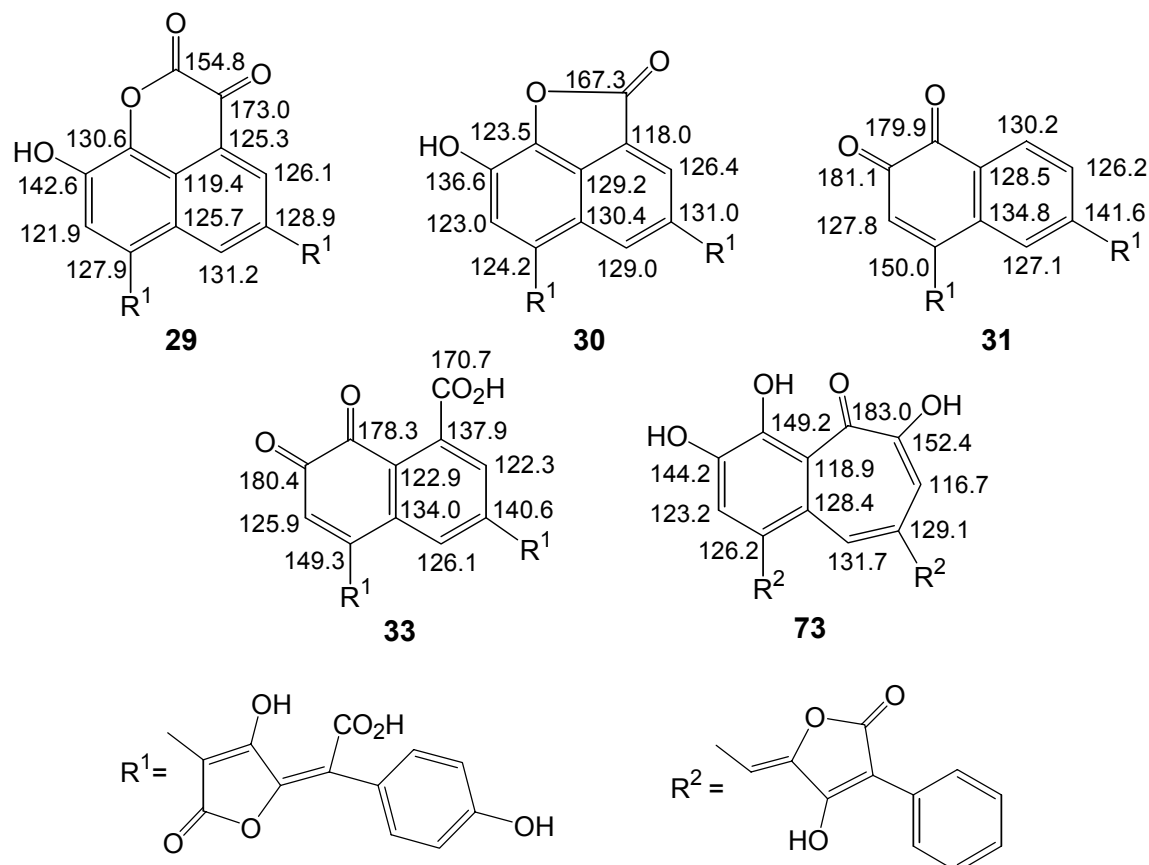


Abbildung 44: Verschiebungen δ_C verschiedener Vergleichsverbindungen

3.3.6 Ein neues Badienderivat beb3

Die Verbindung **beb3**, die nach Badion B (**32**) eluiert wird, weist ein mit **beb1** fast identisches UV/VIS-Absorptionsspektrum auf, lediglich das Absorptionsmaximum liegt um 17 nm hypsochrom verschoben.

Im IR-Spektrum von **beb3** fehlt die Valenzschwingungsbande der wasserstoffbrücken- gebundenen OH-Gruppe bei 3208 cm^{-1} , sonst unterscheiden sich die Spektren beider Verbindungen nicht.

Im Zuge der Aufarbeitung zeigt sich, daß **beb3** auch aus **32** entsteht, vermutlich durch die Einwirkung von Tfa während wiederholter HPLC-Reinigung.

Ein APCI-Massenspektrum zeigt einen Molekülpeak bei m/z 740, es sind im Vergleich zu **32** zwei Protonen mehr enthalten. Ein ebenso intensives Signal wird bei m/z 599 erhalten, welches in die beiden Fragmente m/z 337 und m/z 263 zerfällt. Letzteres spaltet unter Lactonisierung ein Molekül Wasser ab, was charakteristisch ist für Pulvinsäuren unter thermischer Belastung.^[33] Ausgehend von einer großen strukturellen Ähnlichkeit mit Badion B (**32**) könnte es sich um folgendes Zerfallsschema handeln:

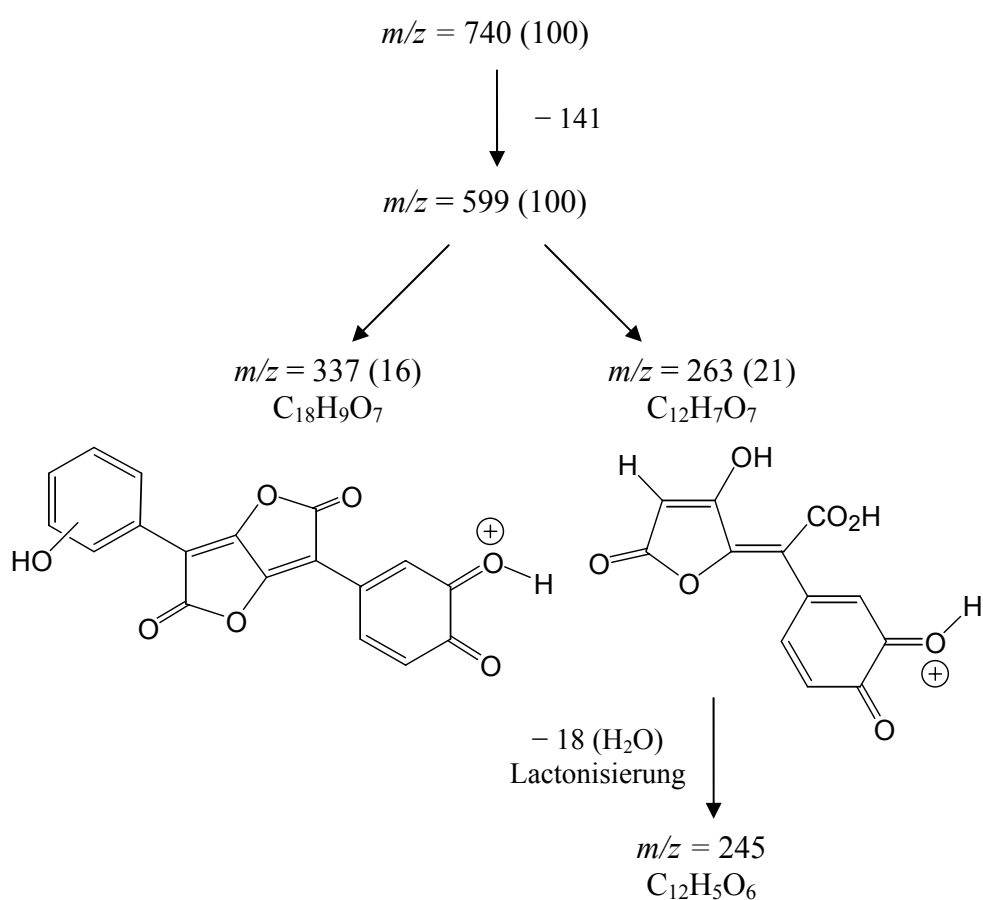


Abbildung 45: Mögliches Fragmentierungsschema von **beb3** im APCI-MS

Die NMR-Spektren von **beb3** weisen große Ähnlichkeit mit denen des Badiions B (**32**) auf.

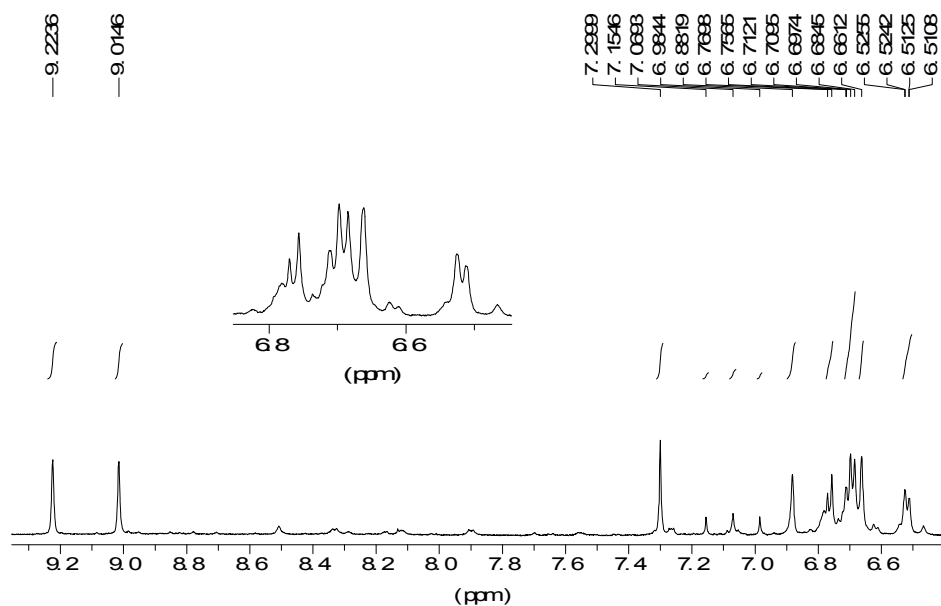


Abbildung 46: ^1H -NMR-Spektrum von **beb3** (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$)

Wiederum liegen die sechs Protonen der beiden dihydroxysubstituierten Pulvinsäurereste im Bereich von δ_{H} 6.52 bis 6.89. Die drei Signale bei δ_{H} 6.98, 7.07 und 7.15 können drei Hydroxygruppen zugeordnet werden. Neben einem Singulett bei δ_{H} 7.30 sieht man zwei weitere Protonen bei δ_{H} 9.00 und 9.22. Anders als bei **beb1** zeigen diese im COSY-Spektrum Kopplungen zueinander und können so, entsprechend **32**, zwei *meta*-ständigen Protonen eines aromatischen Ringes zugeordnet werden. Alle drei Protonen korrelieren auch mit den Kohlenstoffatomen bei δ_{C} 94.8 bzw. 96.9, woraus man auf eine dem Badiion B (**32**) analoge Anordnung der Pulvinsäurereste schließen kann. Darüberhinaus koppelt das Proton bei δ_{H} 9.22 zu einem Carbonylkohlenstoff bei δ_{C} 168.3, während der Wasserstoff bei δ_{H} 7.30 mit dem Signal bei 136.9 Wechselwirkungen zeigt. Folgende Strukturteile können anhand der NMR-Daten ermittelt werden.

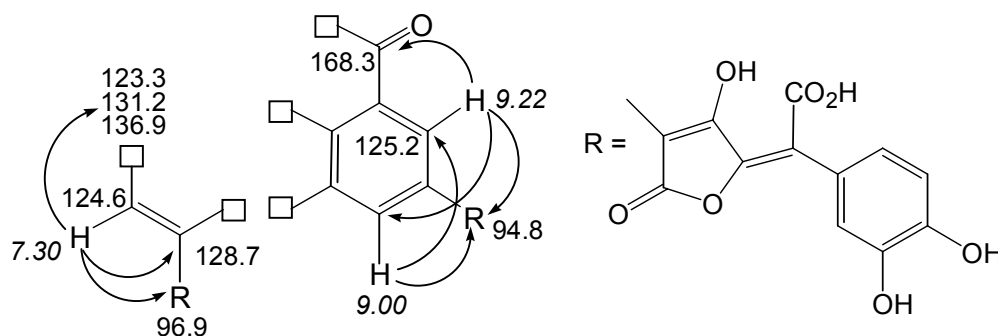


Abbildung 47: Teilstrukturen, ausgewählte HMBC-Korrelationen und Verschiebungen von **beb3**

Für eine dem Norbadian A (**30**) analoge Struktur von **beb3** sprechen nicht nur das UV/VIS-Spektrum und die Farbreaktion mit konz. Ammoniak, sondern auch die im Vergleich zu **32** erhöhte Retentionszeit. Nicht mit der Struktur von **30** zu vereinbaren ist jedoch das Ergebnis der massenspektrometrischen Untersuchung. Da sich die Signale der Carbonylkohlenstoffe teilweise überlagern, kann aus dem ^{13}C -Spektrum nicht die genaue Anzahl der Kohlenstoffatome bestimmt werden. Auch bei **beb3** kann nur anhand der Hochauflösung und weiterer massenspektrometrischer Untersuchungen ein vollständiger Strukturvorschlag ausgearbeitet werden.

3.3.7 Ausblick

Da die Verbindungen **beb1** und **beb3** sich im Laufverhalten nur geringfügig von Badion B (**32**) unterscheiden, ist anzunehmen, daß hier sehr ähnliche Strukturen vorliegen. Problematisch bei der Strukturaufklärung ist, neben der großen Affinität zur Komplexbildung, die geringe Menge, in der beide Verbindungen vorliegen und die oft nur mangelhafte Abtrennung von **32**. Die unbekannten Strukturstücke enthalten wenige Protonen, so daß auch nicht durch Korrelationen auf die fehlenden Strukturstücke geschlossen werden kann. Sicherlich könnten weitere massenspektrometrische Untersuchungen, wie MS/MS-Kopplung oder eine geeignete Derivatisierung der funktionellen Gruppen weitere Beiträge zur Strukturaufklärung leisten.

3.4 *Leccinum chromapes* (Frost) Singer

3.4.1 Der Pilz



Abbildung 48: *Leccinum chromapes*^[80]

Leccinum chromapes (Frost) Singer (= *Tylopilus chromapes* (Frost) Smith & Thiers) (chrome-footed Bolete) ist in Laubwäldern und Mischwäldern im Frühsommer im Osten Nordamerikas sehr verbreitet. Er wächst einzeln oder in Gruppen, bevorzugt unter Espen.

Der halbkugelförmige Hut des jungen Pilzes verflacht mit zunehmendem Alter, seine Größe liegt zwischen 4 und 11 cm. Die filzige, manchmal glatte, bei Nässe klebrige Huthaut ist auffallend pink, rosa oder hellrot gefärbt. Die Farbe verbleicht jedoch später zu blaßrosa oder isabellfarben. Auch unter der Huthaut ist der Pilz kräftig rosa gefärbt. Die Röhren besitzen die gleiche gelblich-bräunliche Farbe wie die kleinen, runden Poren. Die reifen Sporen sind rosabraun, weshalb er auch oft zu *Tylopilus* gestellt wird. Der faserige, meist biegsame, zylindrische Stiel wird bis 13 cm lang und 25 mm dick, er verjüngt sich leicht nach oben und unten. Er ist rauh geschuppt, an der Spitze cremeweiß, sonst hellgelb oder rötlich gefärbt. Das Stielinnere ist faserig und an der Basis leuchtend chromgelb. Auch das Mycel ist kräftig gelb gefärbt. Geschmack und Geruch des Pilzes sind mild und unauffällig. Eine leichte Bläuung des Fleisches bei Verletzung ist nur ganz selten zu beobachten.^[76,77]

3.4.2 Bisheriger Kenntnisstand

Die bereits von Schmidt und Klostermeyer^[20,34] beschriebenen, pulvinsäureähnlichen Verbindungen konnten von Kahner aus den Stielenden des Pilzes isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt werden. Es handelt sich dabei um die hydroxylierten Pulvinsäuren Atromentinsäure (**14**), Isoxerocomsäure (**16**) und Isoxerocomsäure-methylester (**74**). Zudem konnten zwei Acetophenonderivate **75** und **76** charakterisiert werden.^[34]

Der in der Huthaut enthaltene rote Farbstoff konnte bisher noch nicht identifiziert werden. Da der Pilz Isoxerocomsäure (**16**) enthält, liegt die Vermutung nahe, daß es sich um Xerocomorubin (**19**) handeln könnte.

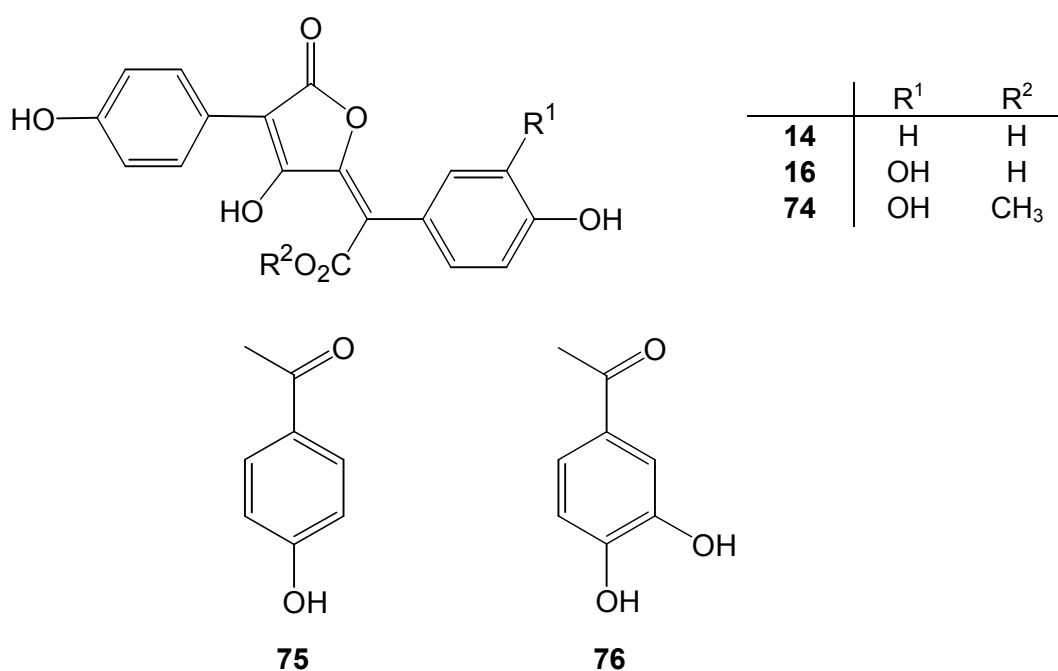


Abbildung 49: Aus *Leccinum chromapes* isolierte Verbindungen

3.4.3 Isolierung des Hutfarbstoffes

Um den Farbstoff in möglichst hoher Konzentration zu extrahieren, werden die Huthäute der getrockneten Pilze abgeschält. Sie werden in etwas Wasser zum Quellen gebracht und mit Aceton, verdünnter Salzsäure und einer Spatelspitze Ascorbinsäure mehrmals extrahiert. Die kräftig rosa gefärbten Extrakte werden eingeeengt, in Wasser aufgenommen und mehrmals gegen Essigsäureethylester ausgeschüttelt. Dabei färbt sich die organische Phase leuchtend orangerot. Nach Trocknung über Natriumsulfat wird der Rückstand durch Gelchromatographie an Sephadex[®] LH 20 mit Aceton/Methanol 4:1 aufgetrennt.

Man erhält drei Fraktionen, die durch analytische HPL-Chromatographie an RP 18 untersucht werden.

Die erste, gelbbraune Fraktion enthält viele farblose Verbindungen und Ergosterol, das durch vergleichende Dünnschichtchromatographie identifiziert wird. Die orange, zweite Fraktion ist ein Gemisch aus den Pulvinsäuren Isoxerocomsäure (**16**) und Atromentinsäure (**14**), die durch Koinjektion mit Vergleichsverbindungen identifiziert werden, und der gesuchten roten Substanz. Die folgende dritte kräftig rosarote Fraktion enthält außer dem gesuchten Farbstoff eine weitere, fast farblose Verbindung mit ungewöhnlichem UV-Spektrum.

Die weitere Trennung erfolgt mittels präparativer HPLC, man erhält beide Verbindungen in analysenreiner Form.

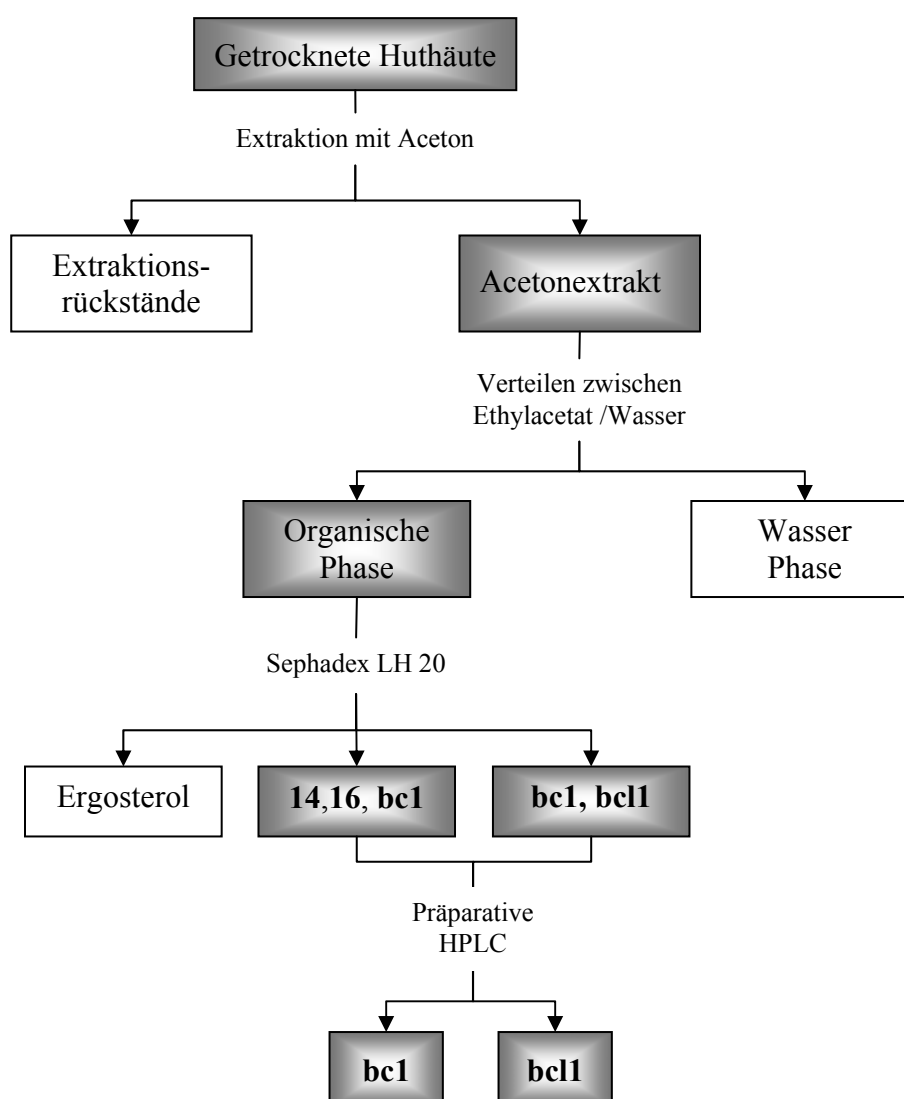


Abbildung 50: Isolierung von **bc1** und **bcl1** aus *Leccinum chromapes*

3.4.4 Identifizierung von bc1

Der dünnstschichtchromatographische Vergleich mit Xerocomorubin (**19**) zeigt, daß es sich um zwei verschiedene Verbindungen handeln muß. Das UV/VIS-Absorptionsmaximum von **bc1** liegt bei 499 nm und ist ausschlaggebend für die tiefröte Farbe.

Im hochaufgelösten EI-Massenspektrum sieht man einen Molekülpeak von m/z 370 mit der Zusammensetzung $C_{18}H_{10}O_9$, es könnte sich also um Variegatorubin (**18**) handeln.

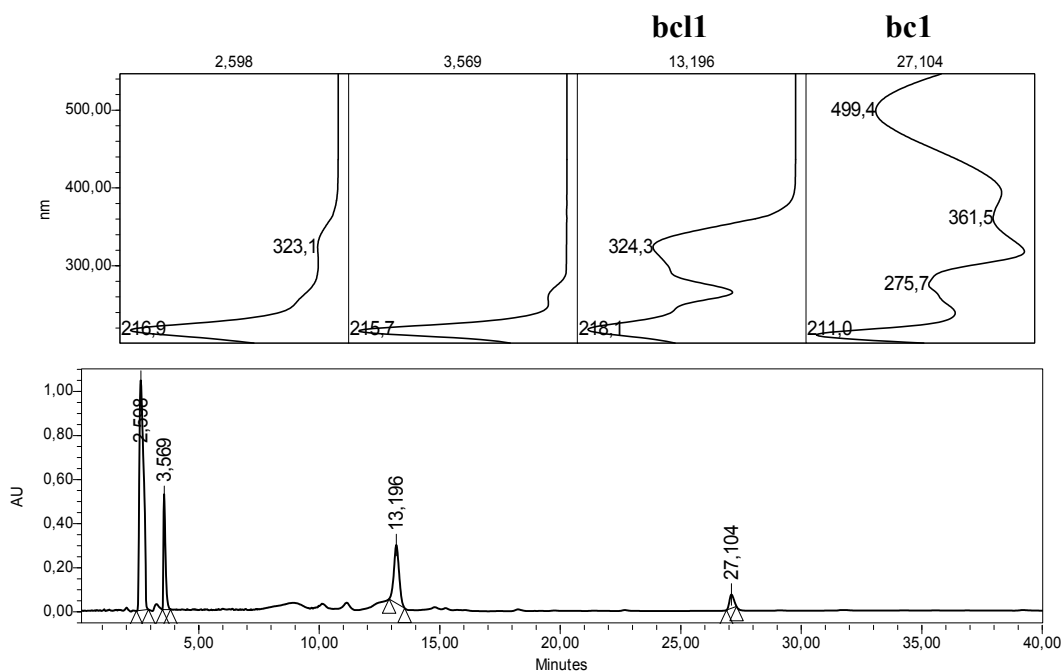


Abbildung 51: HPL-Chromatogramm der Sephadex-Fraktion von *L. chromapes*

Bestätigt wird diese Vermutung durch das Protonenspektrum. Die drei Protonen mit den Verschiebungen δ_H 6.95, 7.64 und 7.78 zeigen das für 1,2,4-trisubstituierten Aromaten typische Kopplungsmuster. Die beiden Singulets bei δ_H 6.88 und 7.36 entsprechen jeweils einem Proton und sind den beiden *para*-ständigen Protonen des zweiten aromatischen Ringes zuzuordnen. Die Verschiebungen der Signale von **bc1** stimmen mit den Literaturdaten für Variegatorubin überein.^[81] Die Koinjektion mit Variegatorubin aus *B. erythropus* zeigt für beide Verbindungen identische Retentionszeiten und bestätigt, daß es sich bei **bc1** um Variegatorubin (**18**) handelt.

Das Vorkommen von Variegatorubin (**18**) ist umso erstaunlicher, da in *Leccinum chromapes* bisher keine Variegatsäure (**17**) nachgewiesen werden konnte. Um das Vorkommen von **17** ganz sicher auszuschließen, werden auch die Reste der Pilzhüte in der beschriebenen Weise aufgearbeitet und analytisch untersucht.

Es konnte jedoch auch bei dieser Vorgehensweise keine Variegatsäure (**17**) nachgewiesen werden.

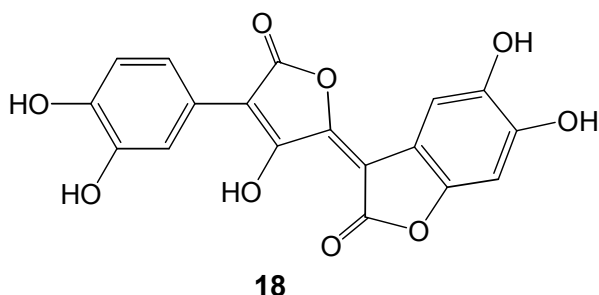


Abbildung 52: Struktur von Variegatorubin (**18**)

3.4.5 Beurteilung des Ergebnisses

Variegatorubin (**18**) entsteht durch Oxidation von Variegatsäure (**17**). Meist geschieht dies schon bei der Extraktion des Farbstoffes, daher ist **18** fast immer in Verbindung mit Variegatsäure (**17**) nachzuweisen. Anders in *Leccinum chromapes*, der überraschenderweise nur das Oxidationsprodukt **18** enthält. Da der Pilz als nur sehr selten leicht bläugend beschrieben wird^[76,77] und keine Variegatsäure nachgewiesen werden konnte, ist anzunehmen, daß diese im Pilz nicht angereichert, sondern sofort enzymatisch oxidiert wird.

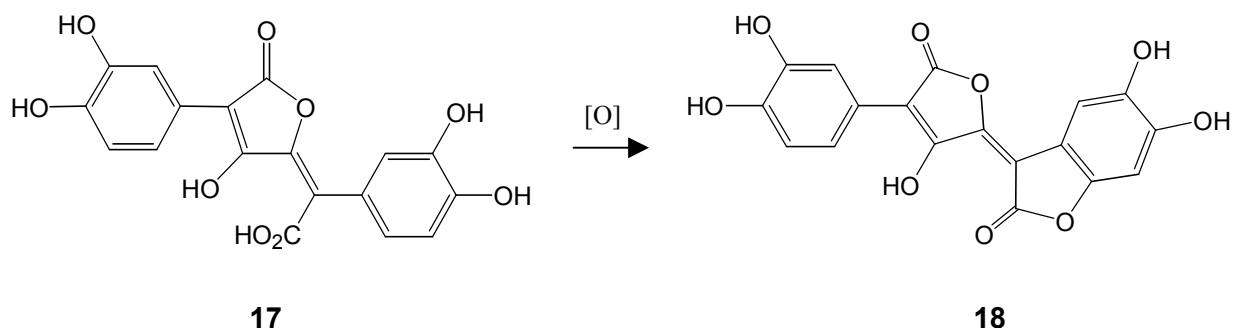


Abbildung 53: Oxidation von Variegatsäure (**17**) zu Variegatorubin (**18**)

3.4.6 Ein neuer Pilzinhaltsstoff

Die zweite, blaßgelbe Verbindung löst sich gut in polaren Lösungsmitteln wie Methanol und DMSO, aber nur unzureichend in Aceton. Mit Eisen(III)chlorid-Lösung färbt **bcl1** graublau, ein Hinweis auf enolische oder phenolische Alkoholgruppen.^[82] Das Absorptionsspektrum zeigt neben einer Schulter bei 249 nm mehrere relative Maxima bei 296, 304 und 323 nm. Es können jedoch weder im EI, ESI noch im FAB-MS ein Molekülpeak oder aussagekräftige Molekülfragmente erhalten werden. Zudem wird versucht, die Polarität der Verbindung durch Derivatisierung aufzuheben, aber weder durch Methylierung mit Diazomethan, Silylierung

mit MSTFA oder Acetylierung mit Acetanhydrid kann ein einheitliches, zur Untersuchung geeignetes Derivat zu erhalten werden.

Das IR-Spektrum zeigt neben der intensiven Bande der OH-Valenzschwingungen bei 3435 cm^{-1} noch zwei Valenzschwingungsbanden konjugierter Doppelbindungen bei 1629 und 1521 cm^{-1} . Die schwache Bande bei 1757 cm^{-1} ist einem Lactonring zuzuordnen. Eine weitere schwache Bande bei 1287 cm^{-1} ist auf C-O-Valenzschwingungen zurückzuführen.

Im ^1H -NMR-Spektrum sind sechs aromatische Protonen zu sehen. Die beide Signale bei δ_{H} 6.56 und 7.03 erscheinen als Dublett eines Dubletts und sind Teil zweier ABX-Spinsysteme. Die stärker entschirmten Protonen bei δ_{H} 6.76 und 7.19 können so anhand des ^1H - ^1H -COSY-Spektrums dem zum Lactonring benachbarten Aromaten zugeordnet werden, während die Dubletts bei δ_{H} 6.67 und 6.70 mit dem Signal bei δ_{H} 6.56 korrelieren. Überdies besitzt **bcl1** zwei aliphatische Protonen die als Dubletts bei δ_{H} 3.71 und 3.78 erscheinen. Die große Kopplungskonstante von $^2J_{\text{HH}}$ 15.6 läßt auf diastereotope, geminale Protonen schließen, was auch durch Cross-Peaks im HMQC-Spektrum bestätigt wird. Die Chiralität der Verbindung zeigt sich auch durch ihre optische Aktivität: Die Substanz besitzt einen Drehwert von $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +4$.

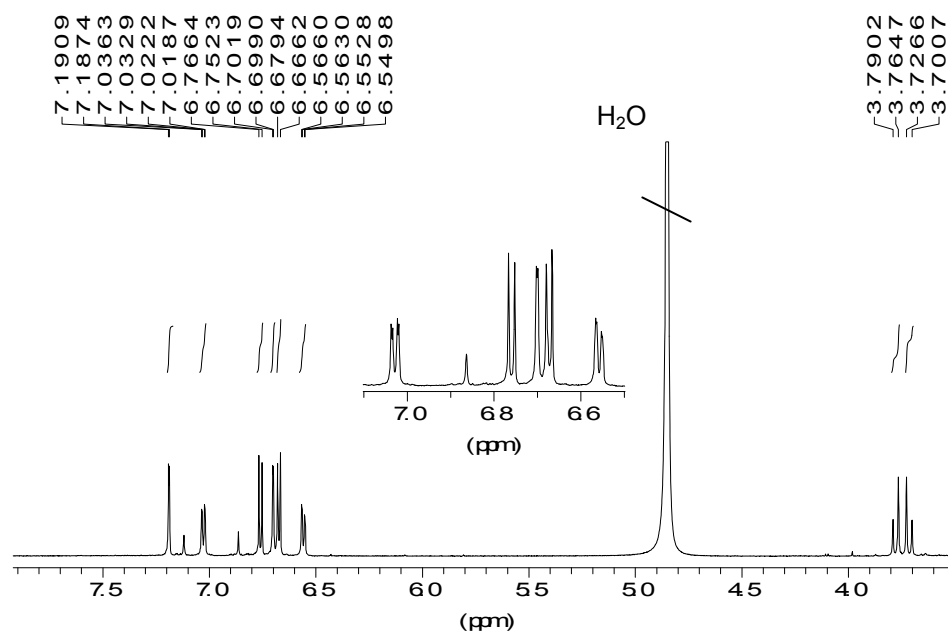
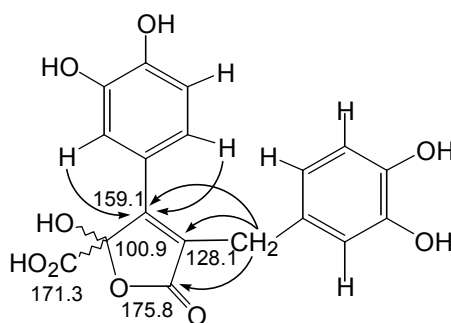


Abbildung 54: ^1H -NMR-Spektrum von **bcl1** (600 MHz, $[\text{D}_4]\text{Methanol}$)

Das ^{13}C -NMR Spektrum zeigt außer den Signalen der beiden aromatischen Ringe und dem der Methylengruppe bei δ_{C} 31.4 noch zwei quartäre Kohlenstoffatome bei δ_{C} 128.1, 159.1 und ein Carbonylkohlenstoff bei δ_{C} 175.8. Die Lage der aromatischen Kohlenstoffe im Bereich

von δ_C 145.9 bis 150.1 lässt auf Hydroxysubstitution schließen, zudem der Nachweis von phenolischen Hydroxygruppen positiv, der Nachweis von Aminogruppen mit Ninhydrin jedoch negativ ausfällt.^[82] Zudem erkennt man im ^1H -NMR-Experiment, aufgenommen in $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, vier zusätzliche Signale im Bereich δ_H 8.78 bis 9.65, die phenolischen Hydroxygruppen zuzuordnen sind. Zwei dieser Signale zeigen auch im HMBC-Spektrum Korrelationen zu den Kohlenstoffen der aromatischen Ringe. Da sich einige Signale überlagern, können die Kohlenstoffe der beiden aromatischen Systeme nur unter Einbeziehung der gekoppelten Spektren (HMQC und HMBC) bestimmt werden. Die Position der CH_2 -Gruppe am Phenylring kann durch Korrelationen der aromatischen Protonen zum Methylenkohlenstoff und durch Wechselwirkungen der aliphatischen Protonen zu den Ringkohlenstoffen eindeutig bestimmt werden. Darüberhinaus koppeln die Methylenprotonen zur Carbonylgruppe des Lactonringes bei δ_C 175.8 und zu den beiden quartären Kohlenstoffatomen bei δ_C 128.1 und 159.1. Zu letzterem korrelieren auch die Protonen des zweiten aromatischen Systems. Dabei erklärt sich die Tieffeldverschiebung des Kohlenstoffes durch die Konjugation zu einer Carbonylgruppe. Das verbleibende Kohlenstoffsignal bei δ_C 171.3 wird einer Carboxylgruppe am Chiralitätszentrum zugeordnet. Die deutliche Tieffeldverschiebung des chiralen Kohlenstoffes von δ_C 100.9 lässt zudem auf Hydroxysubstitution schließen. Der sich daraus ergebende Strukturvorschlag einer arylsubstituierten 2-Hydroxy-5-oxo-2,5-dihydrofuran-2-carbonsäure ist mit den Daten der NMR-Experimente gut vereinbar. Die genaue Stereochemie des Chiralitätszentrums konnte nicht bestimmt werden, womöglich liegt die Verbindung aufgrund von Epimerisierung des Hemiacetals als Racemat vor, was auch den geringen Drehwert erklären würde.



77

Abbildung 55: Strukturvorschlag, ausgewählte HMBC-Korrelationen und Verschiebungen δ_C von Chromapedsäure (77)

Eine Übersicht sämtlicher NMR-Daten gibt nachfolgende Tabelle.

Tabelle 2: Zusammenfassung der NMR-Daten von **77**

Art	δ_C [ppm]	δ_H [ppm]	Multi- plizität	J_{HH} in Hz	$^nJ_{CH}$ (HMBC) δ_C [ppm]
CH ₂	31.4	3.71 3.78	d d	15.6 15.6	117.5, 121.5, 128.1, 131.3, 159.1, 175.8
C _q	100.9				
CH	117.3	6.67	d	8.4	117.5, 121.5, 131.3, 145.9, 147.4
CH	117.5	6.70	d	2.4	31.4, 117.5*, 121.5, 131.3*, 145.9, 147.4
CH	117.5	6.76	d	8.4	117.9*, 124.0, 147.4, 150.1
CH	117.9	7.19	d	2.4	123.9, 147.4, 150.1, 159.1
CH	121.5	6.56	dd	2.4, 8.4	31.4, 117.3, 145.9, 147.4*
CH	123.9	7.03	dd	2.4, 8.4	117.9*, 150.1, 159.1
C _q	124.0				
C _q	128.1				
C _q	131.3				
C _q	145.9				
C _q	147.4				
C _q	147.4				
C _q	150.1				
C _q	159.1				
C _q	171.3				
C _q	175.8				

* schwache Korrelationen

3.4.7 Möglicher Biosyntheseweg der Chromapedsäure (77)

Biosynthetisch leitet sich die aus *L. chromapes* isolierte Chromapedsäure (**77**) wahrscheinlich von zwei Molekülen Arylbrenztraubensäure (**78**) ab, die durch Aldoladdition die Zwischenstufe **79** bilden. Anders als bei der Biosynthese der Retipolide^[61] (siehe auch Kapitel 3.6.7) bildet diese durch Wasserabspaltung die 3,4-ungesättigte 2-Keto-Dicarbonsäure **80**, welche anschließend zu **77** lactonisiert. Der Zeitpunkt der Dihydroxylierung der beiden aromatischen Reste ist nicht bekannt.

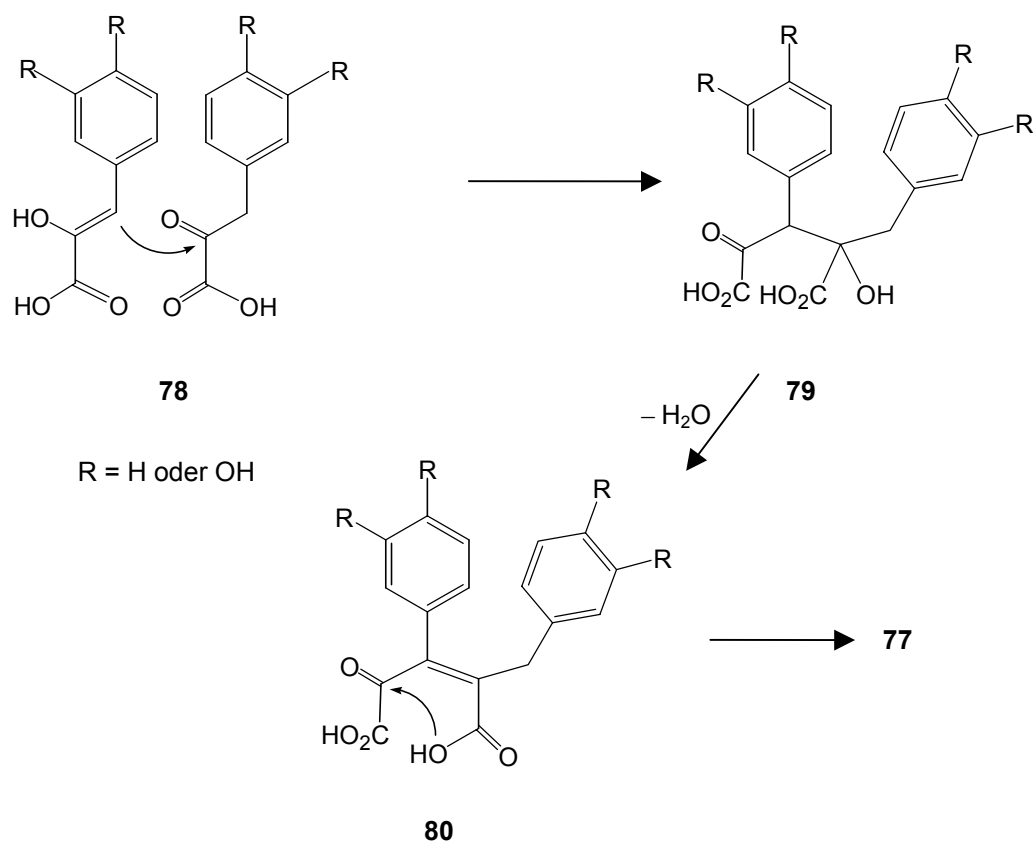
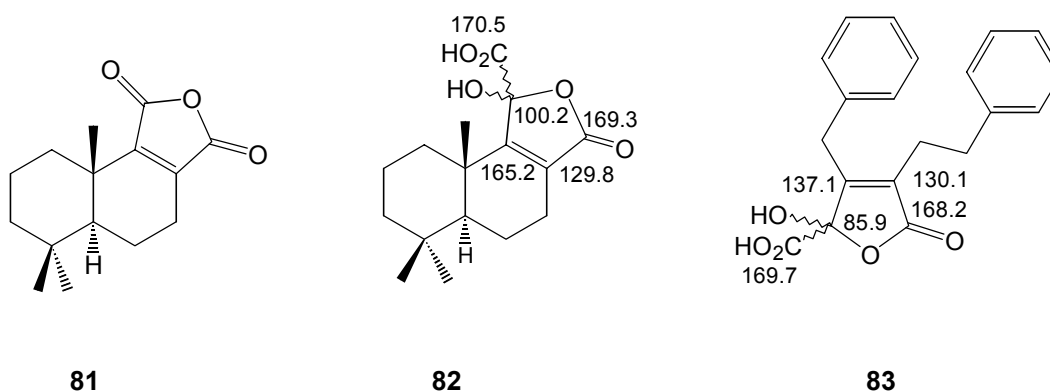


Abbildung 56: Biosynthesevorschlag für 77

3.4.8 Verbindungen mit ähnlicher Struktur

Bisher sind keine Naturstoffe dieser Struktur bekannt. Im Rahmen der Synthese von (+)-Winterin (**81**) erhielten Rodriguez und Hueso-Rodriguez eine Verbindung **82** mit gleicher Furanon-Teilstruktur.^[83] Der Vergleich der NMR-Daten von **77** und **82** zeigen große Übereinstimmung. Auch bei der Lactonsynthese aus (2-Bromoethyl)benzol entsteht eine Verbindung **83** mit diesem System.^[84]

Abbildung 57: Ausgewählte Verschiebungen δ_C der Vergleichsstrukturen

3.4.9 Ein Oxidationsprodukt der Chromapedssäure (77)

Weitere Bestätigung erhält die Struktur von **77** durch das in geringen Mengen entstehende, gelbe Oxidationsprodukt **bcl33**. Dieses besitzt ein UV/VIS-Absorptionsspektrum mit Absorptionsmaxima bei 208, 272 und 384 nm.

Im EI-MS zeigt die Verbindung einen Molekülpeak bei m/z 328 mit der Zusammensetzung $C_{17}H_{12}O_7$. Der Massenverlust von 73 zu m/z 255 entspricht der Abspaltung einer Carbonsäure- und einer CO-Gruppe.

Da sehr wenig Substanz vorhanden ist, kann nur ein 1H -NMR-Spektrum erhalten werden. Dieses zeigt große Übereinstimmung mit den Spektren von **77**. Im Bereich von δ_H 6.59 bis 7.18 erkennt man die Signale zweier ABX-Systeme, die entsprechend der Chromapedssäure (**77**) dem dihydroxysubstituierten Phenyl- und Benzylsystem zugeordnet werden können. Darüberhinaus sieht man zwei Methylenprotonen bei δ_H 3.85, die als Singulett erscheinen, was sich durch Abspaltung einer funktionellen Gruppe vom Chiralitätszentrum dadurch Verlust der Chiralität erklären läßt. Für die Abspaltung einer polaren Gruppe spricht auch die gegenüber **77** erhöhte Retentionszeit bei der HPLC-Trennung.

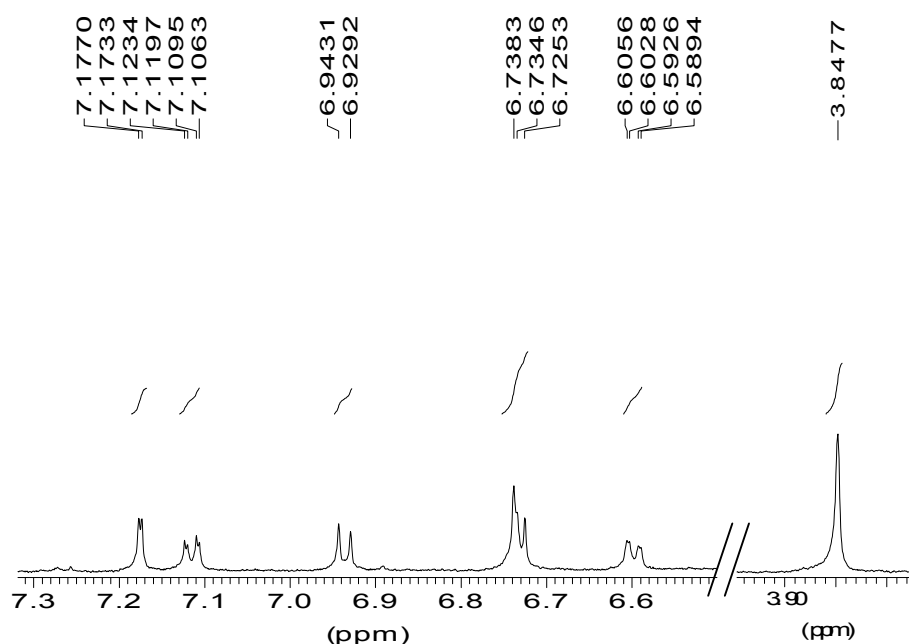


Abbildung 58: 1H -NMR der gelben Verbindung **bcl33**

Anhand der Hochauflösung und des Protonenspektrums kann für **bcl33** die Struktur eines 3-(3,4-Dihydroxy-benzyl)-4-(3,4-dihydroxy-phenyl)-maleinsäureanhydrids **84** bestimmt werden, welche aus **77** durch oxidative Decarboxylierung entsteht. Die gelbe Farbe kommt durch die Konjugation des Maleinsäureanhydridrestes mit dem Dihydroxyphenylring zustande. Ein Vergleich der massenspektrometrischen Daten mit Literaturwerten bestätigt die für diese Substanzgruppe typische Abspaltung im EI-MS von $\text{C}_2\text{O}_3\text{H}$.^[85,86]

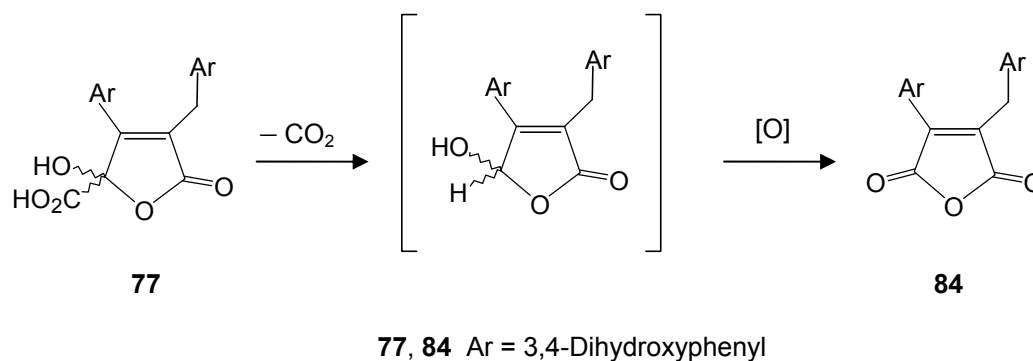


Abbildung 59: Oxidative Decarboxylierung von **77**

Das unhydroxylierte Derivat **85** wurde von Takashi et al. bei der Untersuchung neuer pflanzlicher Wachstumsfaktoren aus Kulturfiltraten des Schimmelpilzes *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter isoliert.^[87] Die Verbindung fördert das Wurzelwachstum von bestimmten Keimlingen.

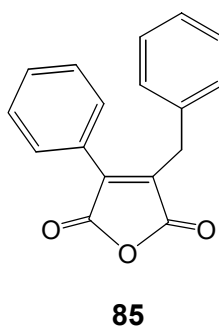


Abbildung 60: Naturstoff **85** aus *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter

3.5 *Boletus griseus* Frost

3.5.1 Der Pilz



Abbildung 61: *Boletus griseus*^[88]

Boletus griseus Frost kommt vor allem im Osten Nordamerikas vor und wächst dort von Juni bis Oktober einzeln oder verstreut unter Eichen oder in grasfreien Hartholzwäldern. Der Hut ist zunächst halbkugelig, dann gewölbt und im Alter fast flach. Er kann eine Größe von 5 bis 15 cm erreichen, ist feinfilzig oder samtig, mit glatter, trockener Oberfläche. Seine Farbe variiert von hell- bis dunkelgrau, manchmal mit ockerfarbenen oder bräunlichen Nuancen, bleibt insgesamt aber eher hell.

Die Röhren sind am Stiel angewachsen und grau, manchmal eher bräunlich gefärbt, ebenso wie die kleinen Poren. Das Sporenpulver ist grünlichgelb bis olivfarben. Der zylindrische, feste Stiel ist genetzt, an der Basis leicht gebogen und wird mitunter im Alter hohl. Seine Größe liegt zwischen 5 bis 10 cm bei einer Stärke von maximal 4 cm. Stiel und Pilzfleisch sind blaßgrau, gelblich oder weiß. Die Farben können an der Basis und der Spitze des Stiels auch ins grünlichgelbe bis orangefarbene gehen, eine deutlich orange Färbung ist meist ein Anzeichen für massiven Madenbefall. Das Fleisch ist sehr mild in Geruch und Geschmack und verfärbt sich nicht bei Druck oder Verletzung.^[72,76,77]

Singer unterscheidet je nach Standort die beiden Varietäten ssp. *typicus*, die in den Eichenwäldern Nordfloridas und New Englands zu finden ist und ssp. *pini caribaeae*, die nur in Monokulturen der Karibischen Kiefer (*Pinus caribaeae*) im Süden Floridas vorkommt.^[72]

Aufgrund der farblichen Variationen des Sporenpulvers und des Fruchtkörpers wird *Boletus griseus* als nahe verwandt mit *Boletus retipes* Berk. & Curt. bzw. *Boletus ornatipes* Peck angesehen.^[18,76]

3.5.2 Bisherige Arbeiten

Obwohl der Pilz bereits wiederholt im Rahmen systematischer Arbeiten untersucht wurde, konnten keine bekannten Farbstoffe entdeckt werden.^[18] Sequenzanalytische Untersuchungen bestätigten neben der morphologischen Ähnlichkeit auch eine große genetische Übereinstimmung mit *Boletus retipes/ornatipes*. Dennoch konnten bisher keine retipolid-ähnlichen Strukturen in *B. griseus* nachgewiesen werden.^[74,89]

3.5.3 Aufarbeitung

Die luftgetrockneten Pilze werden fein zermahlen, in etwas Wasser suspendiert und mit Aceton bis zur Farblosigkeit extrahiert. Man erhält einen gelbbraunen Extrakt. Um Zucker und andere wasserlösliche Bestandteile abzutrennen, wird dieser nach Entfernen des Lösungsmittels in schwach salzsaurem Wasser aufgenommen und mehrmals gegen Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und bis zur Trockene eingeeengt. Die gelbbraune Masse wird in Acetonitril/Wasser im Verhältnis 1:1 gelöst und nach Festphasenextraktion an RP 18 mittels analytischer HPLC untersucht.

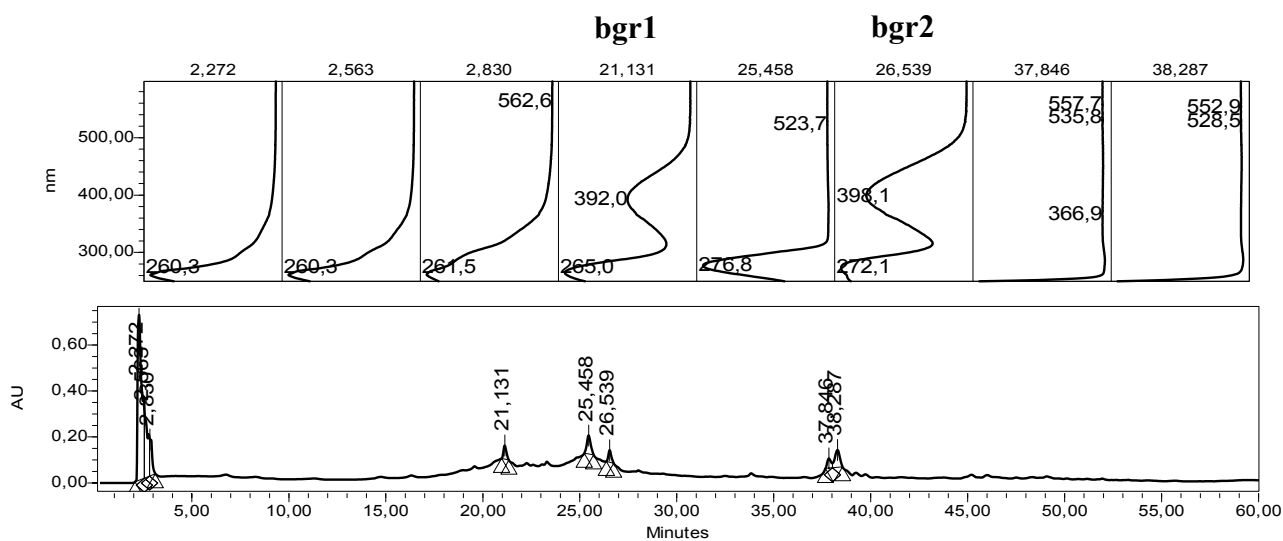


Abbildung 62: HPL-Chromatogramm des Acetonextraktes von *B. griseus*

Das HPL-Chromatogramm zeigt zwei gelbe Verbindungen mit deutlich unterschiedlichen Retentionszeiten. Auf eine weitere Vorreinigung wird verzichtet und die Trennung der beiden Farbstoffe direkt mittels präparativer und semipräparativer HPLC durchgeführt.

Man erhält die beiden Farbstoffe **bgr1** und **bgr2** in analysenreiner Form.

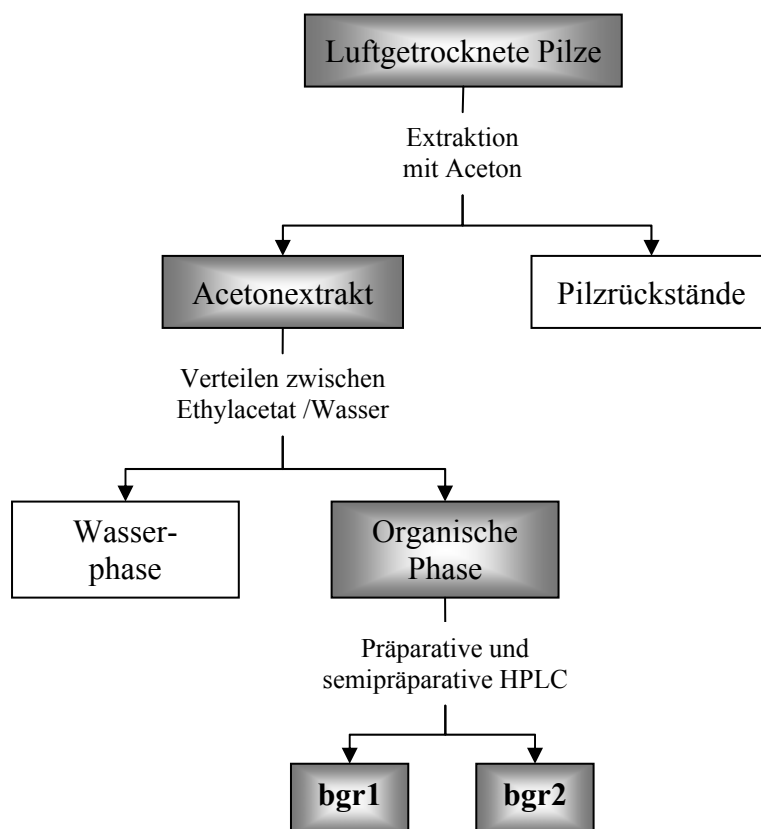


Abbildung 63: Isolierung der Farbstoffe aus *Boletus griseus*

3.5.4 Ein neues Pulvinsäurederivat **bgr1**

Das Absorptionsspektrum von **bgr1** hat große Ähnlichkeit mit dem der Pulvinsäuren. Der dünnschichtchromatographische Vergleich mit Variegatsäure (**17**) zeigt für beide Verbindungen identische R_f -Werte. Anders als Variegatsäure kann **bgr1** jedoch nicht mit Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung zu einem blauen Anion oxidiert werden, sondern verfärbt sich rotbraun. Das bedeutet, daß sich das Substitutionsmuster am Ring A von dem der Variegatsäure (**17**) unterscheidet oder die Hydroxygruppen an diesem Ring nicht frei vorliegen.

Im IR-Spektrum sieht man neben dem Signal der OH-Valenzschwingungen bei 3436 cm^{-1} eine weitere Absorptionsbande bei 1635 cm^{-1} , die Valenzschwingungen aromatischer CC-Doppelbindungen entspricht.

Das (–)-ESI-Massenspektrum zeigt einen Molekülpeak mit m/z 401 $[M-H]^-$, was einer Zusammensetzung von $C_{19}H_{13}O_{10}$ entspricht. Im Vergleich zu Variegatsäure mit der Summenformel $C_{18}H_{12}O_9$, besitzt die Verbindung ein weiteres Sauerstoffatom und vermutlich eine zusätzliche Methylgruppe.

Im ^1H -NMR-Spektrum sind insgesamt acht Protonen zu sehen, davon entfallen drei auf eine Methylgruppe, die als Singulett bei δ_{H} 3.84 erscheint. Die Signale der verbleibenden fünf Protonen liegen im aromatischen Bereich. Das Proton bei δ_{H} 7.79 ist Teil eines ABX-Spinsystems und koppelt mit den Protonen bei δ_{H} 6.80 und 8.00. Die Entschirmung des benachbarten Furanonringes führt zur Tieffeldverschiebung dieser Protonen. Das Singulett bei δ_{H} 6.38 entspricht zwei Protonen, die para oder meta zueinander positioniert sind. Da die beiden Signale zu einem Singulett zusammenfallen, müssen sie gleiche Nachbargruppen besitzen.

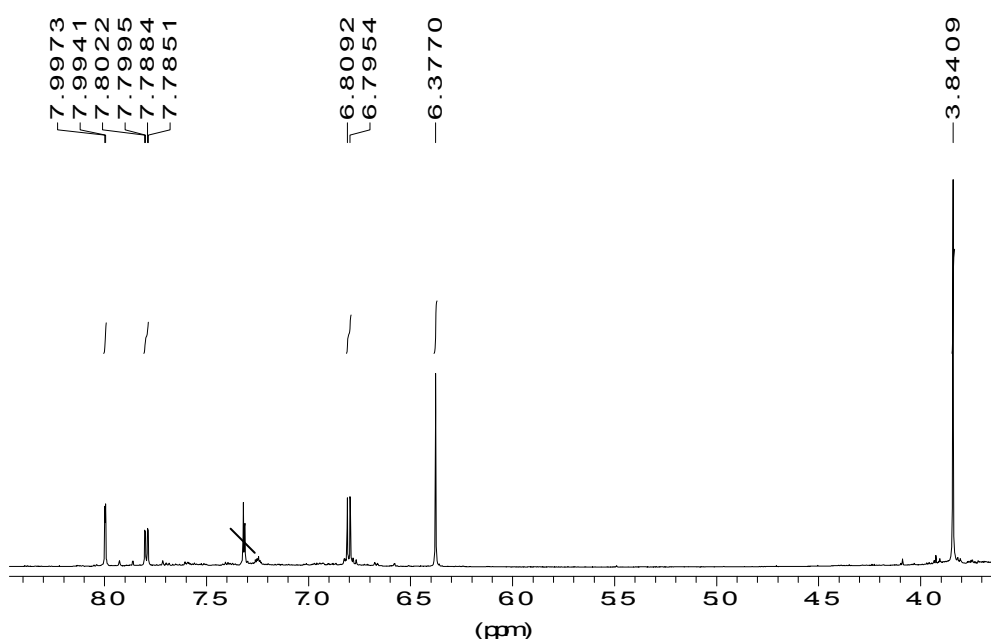


Abbildung 64: ^1H -NMR-Spektrum von **bgr1** (600 MHz, $[\text{D}_6]$ Aceton)

Das ^1H - ^1H -COSY-Spektrum zeigt neben den bekannten Korrelationen eine schwache long-range-Kopplung der Methoxygruppe zu dem Proton bei δ_{H} 8.00. Die 3-Hydroxygruppe des Ringes A ist also methyliert, was auch durch Kopplungen im HMBC-Experiment bestätigt wird.

Das ^{13}C -NMR zeigt nur 16 Signale, da es durch die symmetrischen Elemente des zweiten aromatischen Ringes zu Überlagerungen kommt. So sieht man in der HMBC-Messung neben den $^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungen des Singuletts bei δ_{H} 6.38 zu dem Kohlenstoff bei δ_{C} 110.3 auch die direkte Kopplung zum gleichen Signal. Die weiteren Korrelationen zu den Kohlenstoffen bei δ_{C} 127.0, 132.5 und 144.8 können einem 1,2,3-trihydroxysubstituierten, aromatischen Ring zugeordnet werden. Darüber hinaus koppeln diese Protonen auch zur exocyclischen Doppelbindung und zum Carboxylkohlenstoff.

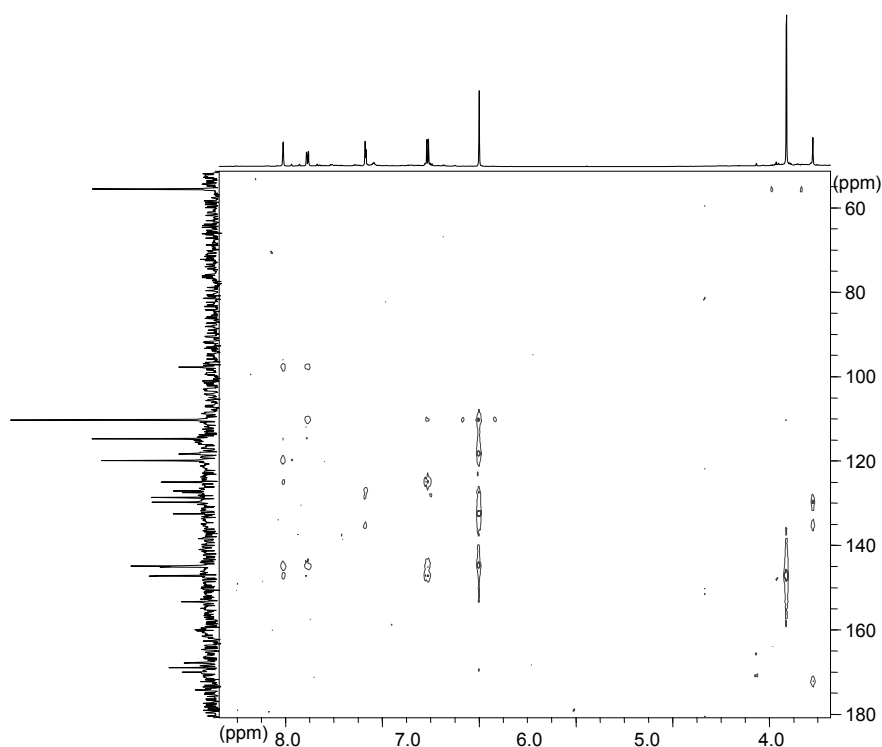


Abbildung 65: HMBC-Spektrum von **bgr1** (600/150 MHz, [D₆]Aceton)

Die Zuordnung der Signale des Furanonringsystems erfolgt anhand ähnlicher Verbindungen. Die Position des trihydroxysubstituierten aromatischen Ringes kann durch den Vergleich mit den NMR-Daten von Gomphidsäure und Isogomphidsäure (**87**) klar bestimmt werden. ^[90,91] Analog zu **87** sind bei **bgr1** die beiden *meta*-positionierten aromatischen Protonen an den stärker abgeschirmten Ring gebunden. Für **bgr1** ergibt sich daher folgender Strukturvorschlag:

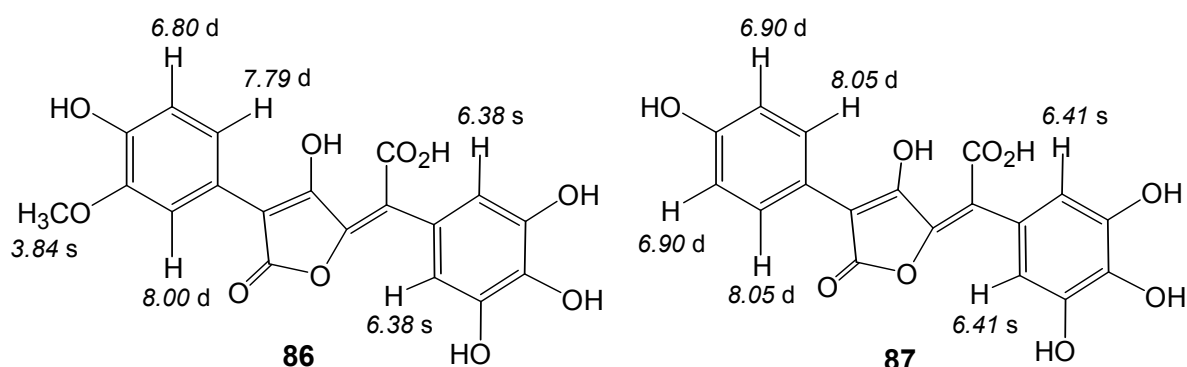


Abbildung 66: Vergleich der ¹H-NMR-Daten von **87** und der für **bgr1** vorgeschlagenen Struktur (**86**)

3.5.5 Ein Pulvinsäurederivat **bgr2**

Die Verbindung mit der höheren Retentionszeit zeigt mit Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung die gleiche Reaktion wie **86**, auch das UV-Spektrum und IR-Spektrum lassen keine wesentlichen Unterschiede erkennen.

Neben den OH-Valenzschwingungen bei 3436 cm^{-1} und den C=C-Valenzschwingungen bei 1629 cm^{-1} ist noch eine Carbonylbande bei 1681 cm^{-1} zu sehen.

Der $[M-H]^-$ -Peak des (-)-ESI-Massenspektrums mit m/z 415 ist um 14 Masseneinheiten erhöht, vermutlich besitzt **bgr2** eine weitere Methylgruppe.

Tatsächlich ähneln sich auch die ^1H -NMR-Spektren beider Verbindungen sehr, die drei Protonen des Ringes A bei δ_{H} 6.91, 7.65 und 7.76 bilden ebenfalls ein ABX-System, während das Signal bei δ_{H} 6.45 wiederum den beiden Protonen des zweiten Ringes entspricht. Wie erwartet, sind im Bereich der Methoxyprotonen zwei Signale bei δ_{H} 3.88 und 3.90 zu sehen. Das Singulett bei δ_{H} 3.90 zeigt im HMBC-Spektrum eine Korrelation zu dem Carboxylkohlenstoff bei δ_{C} 172.3, es handelt sich also um den Methylester von **86**.

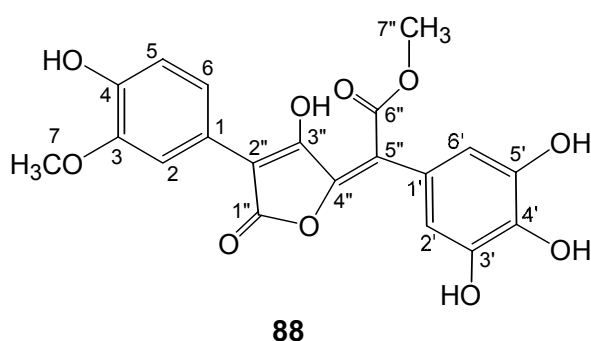


Abbildung 67: Strukturvorschlag für **bgr2**

Da die gesamte Aufarbeitung in Abwesenheit von Methanol durchgeführt wurde, ist auszuschließen, daß es sich hierbei um ein Artefakt handelt.

Die Substanz ist identisch mit der von Kahner isolierten Verbindung aus *Tylopilus nigerrimus*, was zudem durch Coinjektion bestätigt werden kann.^[34] Da die Verbindung damals nur als Gemisch zusammen mit Variegatsäuremethylester erhalten werden konnte, war die exakte Zuordnung aller Verschiebungen nicht möglich, weshalb die NMR-Daten von **88** in nachstehender Tabelle zusammengefaßt werden.

Tabelle 3: Zusammenstellung der NMR-Daten von **88** aus *B. griseus*

C-Atom δ_C [ppm]		δ_H [ppm] Multiplizität		1H - 1H -COSY δ_H [ppm]	$^nJ_{CH}$ -Kopplungen (HMBC) δ_C [ppm]
1	121.8				
2	111.4	7.76	d	7.65	104.7, 121.8, 147.3
3	147.6				
4	147.3				
5	115.3	6.91	d	7.65	121.8, 147.3
6	121.5	7.65	dd	6.91, 7.76	104.7, 111.4, 147.3
7	55.7	3.88	s		147.6
1'	123.7				
2', 6'	109.9	6.45	s		109.9, 116.4, 123.7, 133.7, 145.5
3', 5'	145.5				
4'	133.7				
1''	166.4				
2''	104.7				
3''	159.1				
4''	153.5				
5''	116.4				
6''	172.3				
7''	54.1	3.90	s		116.4, 172.3

3.5.6 Acetylierung von 86 und 88

Von den isolierten Farbstoffen werden 0.5 bzw. 0.8 mg in Acetanhydrid gelöst, mit einer Spatelspitze DMAP versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Verteilung zwischen Wasser und Diethylether wird von der organischen Phase ein (-)-ESI-Massenspektrum aufgenommen.

Für **86** kann unter diesen Bedingungen kein Acetylierungsprodukt erhalten werden. Das Acetylierungsprodukt von **88** zeigt den massenhöchsten Peak bei m/z 583, was einer Zusammensetzung von $C_{28}H_{23}O_{14}$ und damit vierfacher Acetylierung entspricht.

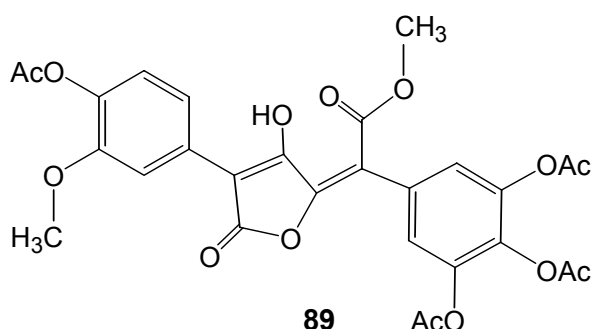


Abbildung 68: Acetylierungsprodukt von **88**

3.5.7 Chemotaxonomische Betrachtung

Bresinsky und Besl vermuten aufgrund ähnlicher Färbung und fehlender bekannter Pulvinsäuren eine enge Verwandtschaft des Pilzes *Boletus griseus* mit den Pilzen *B. retipes* und *B. ornatipes* aus der Subsektion *Reticulati*.^[18,76,89]

Neuere Arbeiten auf molekularbiologischer Basis bestätigen diese enge Beziehung, zudem wird innerhalb des Komplexes *B. retipes/B. ornatipes/B. flavoniger* eine weitere Gruppierung für die Arten *Tylopilus nigerrimus*, *Tylopilus spec.* und *Boletus griseus* erstellt. Schließlich wird für diese Arten die Gattung *Retiboletus* etabliert und neu beschrieben.^[74,89] Die Ergebnisse dieser chemotaxonomischen Untersuchung stimmen der verwandtschaftlich nahen Stellung von *B. griseus* zu *Tylopilus spec.* und *T. nigerrimus* Heim zu, können jedoch die große Ähnlichkeit zur Gruppe *Ornatiboletus* nicht bekräftigen. Vielmehr scheinen diese Arten aus pigmentchemischer Sicht der Gattung *Boletus* näher zu stehen.

Obwohl *Boletus griseus* morphologisch und farblich *B. retipes/ornatipes* sehr ähnlich ist, sind keine aus dieser Gruppe bekannten Pigmente wie Retipolide oder Xerocomsäure enthalten. Auch der für diese Gruppe typische bittere Geschmack fehlt, das Pilzfleisch wird sogar als sehr mild schmeckend beschrieben.^[72,76,77]

3.6 *Boletus retipes* Berk. & Curt.

3.6.1 Pilzbeschreibung



Abbildung 69: *Boletus retipes*^[92]

Der Pilz *Boletus retipes* Berk. & Curt. wächst im Sommer in Nordamerika und Japan bevorzugt auf sandigem Boden am Rand von Misch- und Laubwäldern, an Straßen oder Böschungen. Der Pilzhut ist anfangs gewölbt und wächst sich fast flach aus. Seine matte, samtige bis filzige Oberfläche wird bei Regen leicht klebrig. Der anfangs gelbe bis ockergelbe Pilz ändert seine Farbe nach olivbräunlich oder schmutzig-gelbgrau im Alter. Die erst zitronengelben Poren und Röhren des Pilzes werden im Alter orangebraun. Der feste, zylindrische Stiel ist chromgelb, deutlich genetzt und zwischen 8-15 cm lang, bei einer Stärke von 1-2 cm. Das Fleisch des Pilzes zeigt bei Verletzung keine Blaufärbung und schmeckt leicht bis stark bitter. Ein pulveriger, gelber Überzug wird nur bei manchen Exemplaren vorgefunden, die aufgrund dieses Merkmals von manchen Autoren zu *B. retipes* gezählt werden.

Snell und Dick beschreiben, daß diese Pulverschicht vor allem in südlicheren Gebieten vorhanden ist und differenzieren, so wie Smith und Thiers, zwischen *B. retipes* und *B. ornatipes*.^[76,77] Während Berkeley und Curtis erstmals diesen Pilz als *B. retipes* beschrieben, benannte Peck sehr ähnliche Pilzkollektionen ohne Pulverschicht als *B. ornatipes*.^[59]

Oftmals werden beide Bezeichnungen synonym verwendet, da das anfangs geforderte Unterscheidungsmerkmal der gelben Pulverschicht nicht konstant auftritt und somit nicht als sicheres Merkmal angesehen werden kann. Singer verwendet die Bezeichnungen *Boletus retipes*, *Pulverboletus retipes* und *Boletus ornatipes* synonym.^[72]

3.6.2 Bisherige Arbeiten

Neben einer Vielzahl systematischer Arbeiten, die jedoch die Problematik der verschiedenen Morphologie und Unterscheidung der Gattungen nie restlos klären konnten, war die auffällige Gelbfärbung des Pilzes bereits mehrmals Gegenstand pigmentchemischer Untersuchungen. Obwohl Herrmann das Hauptpigment isolieren konnte^[52], gelang erst Klamann die Aufklärung von Teilstrukturen der Haupt- und einer Nebenverbindung.^[93] Hydroxypulvinsäuren, wie sie für die Familie der Röhrlinge typisch sind, konnten bis dahin nicht nachgewiesen werden.^[52,93]

Als größtes Problem erwies sich immer die Instabilität der Verbindungen, die auch nicht durch die gängigen Derivatisierungen aufgehoben werden konnte.

Den Durchbruch bei der Strukturaufklärung erzielte Justus, der durch die Derivatisierung zum Retipolid A-Methoxyfulven (**90**) ein stabiles Derivat erhielt. Bestätigung fand dieser Strukturvorschlag durch eine Einkristall-Röntgenstrukturanalyse des kristallinen Retipolid A-Butoxyfulvens. Darüberhinaus konnte er die Strukturen der Begleitverbindungen Retipolid B (**58**), C (**59**), D (**60**) und E (**61**) bestimmen. Die potentiellen biosynthetischen Vorläufer Tyrosol (**91**), *seco*-Retipolid E (**62**) und Anhydro(bis-*p*-hydroxyphenylbrenztraubensäure)-methylester (**92**) konnte Justus durch Koinjektion nachweisen, die beiden letzteren erst nach Anreicherung durch wiederholte HPLC.^[61] Die Vergleichsverbindungen wurden von Ingerl und Justus synthetisiert.^[61,94] Auch **61** ist auf synthetischem Wege zugänglich.^[61,94] In einem Exemplar mit besonders dunkler Huthaut konnte Xerocomsäure (**15**) nachgewiesen werden.^[61]

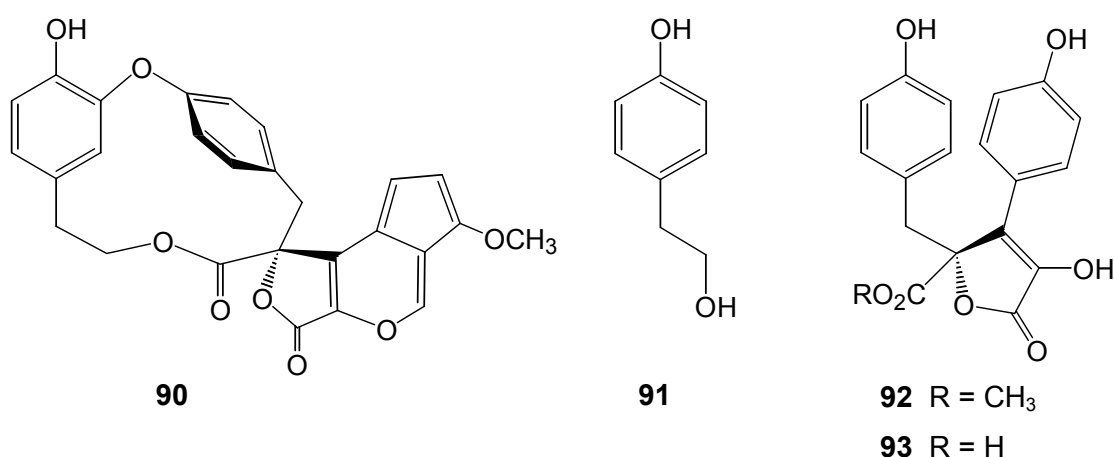


Abbildung 70: Methoxyfulvenderivat (**90**) und potentielle Biosynthesevorläufer **91**, **92** und **93** von Retipolid A

Zur Bestätigung des möglichen Biosyntheseweges wurde von Hellwig ¹³C-markierte Anhydro(bis-*p*-hydroxyphenylbrenztraubensäure) (**93**) und deren Methylester (**92**) verimpft, es war jedoch kein Einbau in Retipolid A (**57**) nachzuweisen.^[59]

Auf die Unterscheidung der Arten *Boletus retipes* und *Boletus ornatipes* wurde bis dahin nicht geachtet, vielmehr ist zu vermuten, daß Herrmann, Klamann und Justus mit Mischkollektionen arbeiteten.

Hellwig hat im Rahmen ihrer chemotaxonomischen Untersuchungen in Zusammenarbeit mit Arnold und Binder zahlreiche Kollektionen und Herbarbelege aus den USA, Japan und Costa Rica einem HPLC-Screening auf ihre Zusammensetzung hin unterzogen und konnte dabei die Pilze in drei Gruppen einordnen.^[59] Während Pilze der Gruppe 3 fast das ganze Spektrum der Retipolide enthalten (Retipolid A (**57**), B (**58**), C (**59**), D (**60**) und *seco*-Retipolid E (**62**)), sind in Pilzen der Gruppe 2 nur die Pigmente Retipolid A (**57**) und C (**59**) zu detektieren. Die meisten Vertreter gehören der ersten Gruppe an, die neben den Retipoliden A (**57**), C (**59**), E (**61**) und *seco*-Retipolid E (**62**) auch Xerocomsäure (**15**) und eine blaßgelbe Nebenverbindung beinhalten. Hellwig schlägt vor, diese Substanz als chemotaxonomischen Marker zur Abgrenzung der Arten *B. retipes*/*B. ornatipes* zu verwenden.^[59]

Die Ergebnisse des HPLC-Screenings werden durch molekularbiologische Untersuchungen dieser Kollektionen von Binder gestützt.^[74] Er postuliert die Zusammenfassung der beiden sogenannten „Lectotypen“ zu einer Gruppe „*Ornatiboletus*“, da auch diese Untersuchung keine eindeutigen Aussagen zur Unterscheidung von *Boletus retipes* und *Boletus ornatipes* liefern kann. Auf diesen Erkenntnissen und erneuten Untersuchungen basierend wird von Binder und Bresinsky eine neue Gattung *Retiboletus* Binder & Bresinsky aufgestellt. Sie enthält neben *Retiboletus ornatipes* (Peck) Binder & Bresinsky, die nach Hellwig der Gruppe 1 angehören, die Art *Retiboletus retipes* (Berk. & Curt.) Binder & Bresinsky, entsprechend Gruppe 2 und 3 nach Hellwig. Auch die Arten *Retiboletus flavoniger* (Halling, Miell. & Gómez) Binder & Halling (= *Boletus flavoniger* Halling), *Retiboletus griseus* (Frost) Binder & Bresinsky (= *Boletus griseus* Frost) und *Retiboletus nigerrimus* (Heim) Binder & Bresinsky (= *Tylopilus nigerrimus* Heim) werden von Binder und Bresinsky dieser neuen Gattung zugeordnet.^[89]

3.6.3 Ziel dieser Arbeit

Der von Hellwig isolierte, äußerst oxidationsempfindliche, chemotaxonomische Marker konnte wegen Substanzmangels nur teilweise aufgeklärt werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun aus weiteren Kollektionen diese Verbindung isoliert und ein Strukturvorschlag ausgearbeitet werden.

3.6.4 Isolierung der Inhaltsstoffe

Es standen mehrere Kollektionen zur Verfügung, wovon jeweils ca. 0.5 g zerkleinert, extrahiert und durch analytische HPLC an RP 18 untersucht wurden. Die Kollektionen mit dem höchsten Gehalt der gesuchten Verbindung werden dann in kleinen Mengen aufgearbeitet, um eine Zersetzung der Inhaltsstoffe im Extrakt zu vermeiden. Nach zahlreichen Versuchen zur Vorreinigung und Vortrennung des schwarzen Rohextraktes wird dann doch auf eine schnelle, unkomplizierte Aufarbeitung durch direkte Trennung mittels HPLC zurückgegriffen. Teilweise wird auch auf eine Verteilung zwischen Wasser und Ethylacetat verzichtet, da es keine Vorteile bei der Trennung brachte.

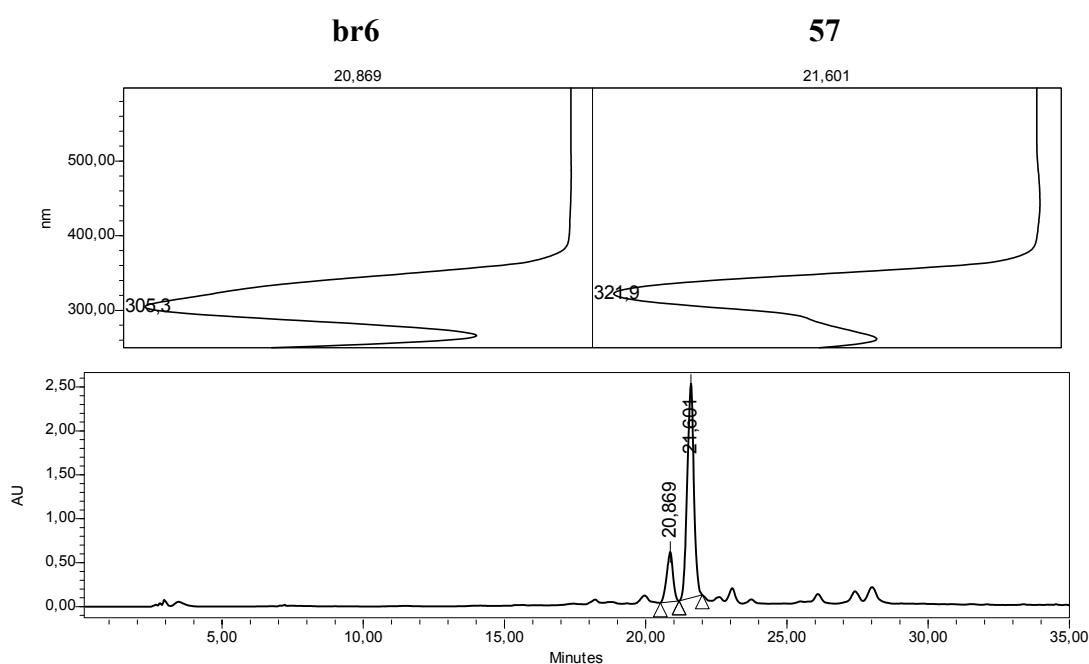


Abbildung 71: HPL-Chromatogramm des Rohextraktes von *B. retipes*

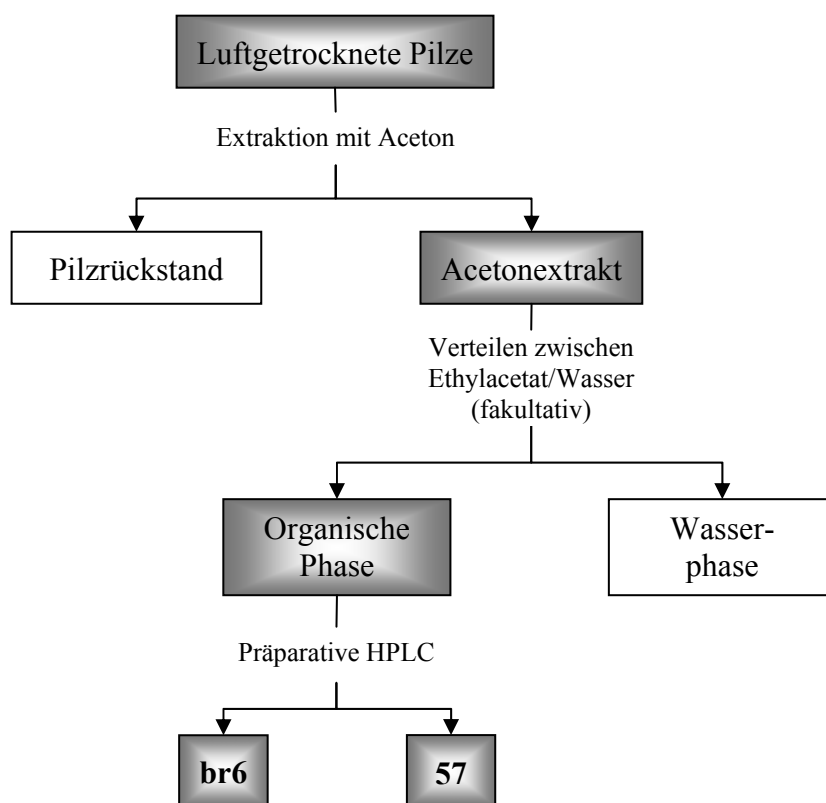


Abbildung 72: Isolierung von Retipolid A (57) und br6

3.6.5 Probleme bei der Isolierung

Die Inhaltsstoffe des Pilzes sind sehr oxidationsempfindlich und bilden schnell schwarze, schwerlösliche Niederschläge. Diese können größtenteils abgetrennt werden, indem die Probe in einem Gemisch aus Acetonitril/Wasser im Verhältnis 1:1 bis 2:3 gelöst und anschließend über eine RP 18 Kartusche filtriert wird. Um die Bildung dieser Niederschläge weitgehend zu vermeiden, stellt man jeweils nur die am gleichen Tag aufzutrennende Menge Pilzextrakt her. Da die Verbindungen im Rohextrakt bei -10°C relativ stabil sind, wird wiederholtes Einengen vermieden und die vorbereitete Lösung im Gefrierschrank aufbewahrt. Die Fraktionen der Trennungen fängt man unter Argon und Eiskühlung auf. Nach Entfernen des Lösungsmittels bei Raumtemperatur und anschließender Gefriertrocknung werden die Fraktionen bis zur Messung bei -10°C aufbewahrt.

3.6.6 Strukturaufklärung

Im IR-Spektrum der Verbindung **br6** sind neben der breiten Bande der OH-Valenzschwingung bei 3436 cm^{-1} auch vier Absorptionsbanden im Bereich der C=O-Valenzschwingungen bei 1779 , 1728 , 1684 und 1637 cm^{-1} zu sehen. Außer den aromatischen Valenzschwingungen bei 1512 cm^{-1} erkennt man noch weitere Banden im finger-print-Bereich bei 1266 und 1209 cm^{-1} . Diese sind charakteristisch für Esterbindungen.

Das UV/VIS-Absorptions-spektrum unterscheidet sich wenig von dem des Retipolid A (**57**), das Absorptionsmaximum bei 302 nm ist gegenüber **57** um 8 nm hypsochrom verschoben. Die Verbindung besitzt in Acetonitril einen Drehwert von $[\alpha]_D^{20} = +144$. Das CD-Spektrum von **br6** ähnelt dem des Retipolids A (**57**) stark. Neben einem stark positiven Maximum im Bereich von 234 nm ist noch ein schwaches Maximum bei 296 nm zu erkennen.

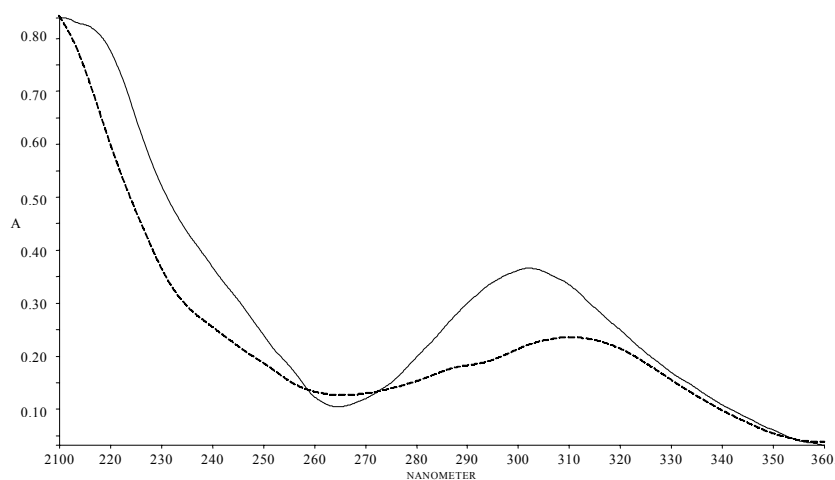


Abbildung 73: UV/VIS-Spektren von Retipolid A (**57**) (---) und **br6** (—)

Das ^1H -NMR-Spektrum zeigt neben sechs Signalen im aromatischen Bereich zehn aliphatische Protonen. Aus dem ^1H - ^1H -COSY-Spektrum geht hervor, daß die Signalgruppen bei δ_{H} 6.79, 7.06 und 7.31 ein trisubstituiertes, aromatisches System bilden. Die Protonen bei δ_{H} 6.83, 7.02 und 7.05 sind Teil eines zweiten ABX-Spinsystems. Durch weitere Korrelationen erkennt man die Verknüpfung der beiden Ringe mit dem aliphatischen Teil des Moleküls. So koppelt das aromatische Proton bei δ_{H} 7.06 mit dem aliphatischen bei δ_{H} 3.24 und das Proton bei δ_{H} 7.05 mit dem bei δ_{H} 4.24.

Obwohl die aliphatischen Signale bei δ_{H} 2.79, 3.03, 3.24, 4.21, 4.24, 5.03 als Methingruppen erscheinen, geht aus dem HMQC-Spektrum hervor, daß es sich um CH_2 -Gruppen mit diastereotopen Protonen handelt. Vergleicht man dies mit NMR-Spektren von Retipolid A (**57**), so zeigt sich, daß hier die makrocyclische Lactonstruktur zur Aufhebung der freien

Drehbarkeit führt. Die sterisch fixierten Protonen besitzen dadurch eine chemisch unterschiedliche Umgebung, was sich in unterschiedlichen Verschiebungen äußert. Vermutlich liegt bei **br6** ein ähnlich gespanntes System vor, da hier die einzelnen Methylenprotonen bis zu 1.21 ppm differierende Verschiebungen aufweisen. Zu den Korrelationen mit den aromatischen Ringen zeigen die CH₂-Gruppen auch Kopplungen untereinander. Die beiden Methylengruppen bei δ_{H} 2.56 und 3.14 besitzen keine diastereotopen Protonen und korrelieren nicht mit den übrigen Signalen. Ein weiteres Proton bei δ_{H} 6.53 erscheint als isoliertes, verbreitertes Singulett.

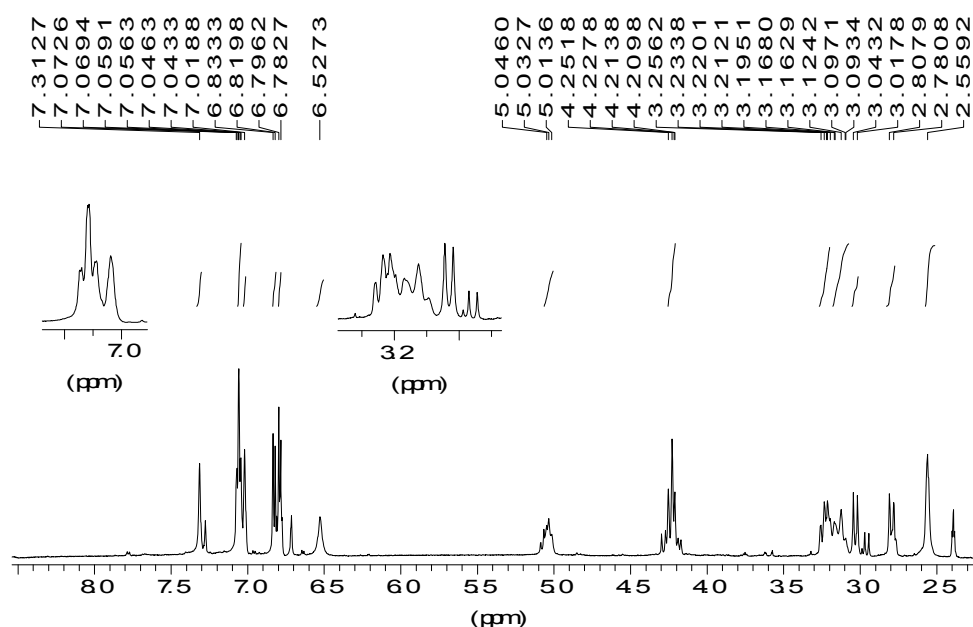


Abbildung 74: ¹H-NMR-Spektrum von **br6** (600 MHz, 270 K, [D₆]Aceton)

Die Auswertung der gekoppelten ¹H-¹³C-Spektren ermöglicht die Zuordnung der Ring-Kohlenstoffe. Die beiden Signale bei δ_{C} 153.6 sind charakteristisch für hydroxysubstituierte, aromatische Kohlenstoffe. Die Protonen bei δ_{H} 7.02 und 7.31 zeigen jeweils Korrelationen zu einem Kohlenstoff des anderen Ringes, was auf eine direkte C-C-Verknüpfung der beiden Aromaten schließen lässt. Auch fehlt bei **br6** die bei Retipolid A (**57**) beobachtete Abschirmung des einzelnen aromatischen Protons durch den Anisotropiekegel des zweiten Phenylringes. Dies ist ebenfalls ein Indiz für die direkte Verbrückung und damit andere relative Anordnung der Ringe zueinander. Die Tieffeldverschiebung der Methylengruppe bei δ_{C} 70.1 erklärt sich durch die Nachbarschaft zum Lacton-Sauerstoff. Sowohl diese als auch die Methylengruppe bei δ_{C} 41.2 korrelieren mit dem Kohlenstoff der Estergruppe bei δ_{C} 171.4. Die Position des quartären Kohlenstoffs bei δ_{C} 87.76 wird durch Wechselwirkungen mit der CH₂-Gruppe bei δ_{C} 41.2 und durch Vergleich mit Daten von **57** bestimmt.

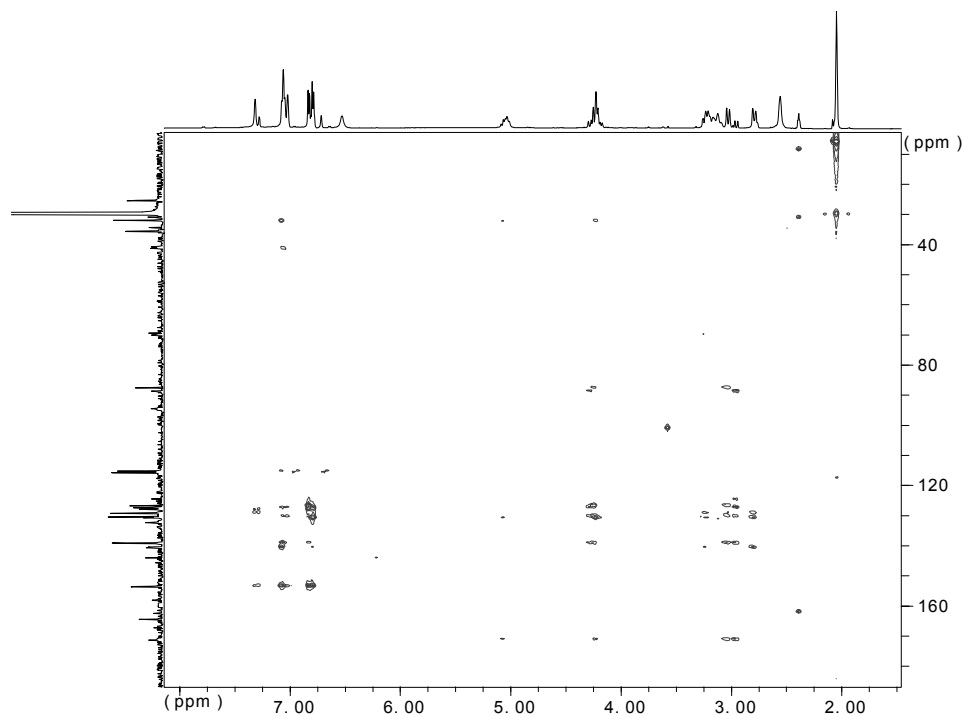


Abbildung 75: HMBC-Spektrum von **br6** (600/150 MHz, $[D_6]$ Aceton)

Überdies bestätigen die NOE-Korrelationen der räumlich benachbarten Protonen die Lactonstruktur. So kann man Wechselwirkungen des aromatischen Protons bei δ_H 7.31 mit den Protonen der beiden Methylengruppen bei δ_H 3.24 und 5.03 beobachten. Das Proton des zweiten Ringes bei δ_H 7.02 hingegen zeigt eine long-range-Kopplung zu dem anderen Methylenproton bei δ_H 4.21, was sich durch eine leicht verdrehte Anordnung der aromatischen Ringe zueinander erklären läßt. Folgender Teilstrukturvorschlag ergibt sich für **br6**:

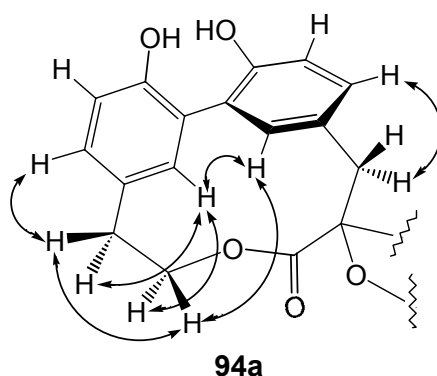


Abbildung 76: Ausgewählte NOE-Korrelationen des Makrolactonringes von **br6**

Zusätzliche Bestätigung erhält diese Teilstruktur durch den Vergleich der EI-Massenspektren von Retipolid A (**57**) und des chemotaxonomischen Markers **br6** nach Silylierung mit MSTFA.^[59] Hellwig erhielt für die Nebenverbindung aus *B. retipes* einen Molekülpeak bei m/z 836 mit der Zusammensetzung $C_{41}H_{60}O_9Si_5$, entsprechend einer fünffachen Silylierung. Anders als beim Zerfall von silyliertem Retipolid A, zeigt das Silylierungsprodukt von **br6** kein Fragment mit m/z 297 ($C_{18}H_{21}O_2Si$). Die andersartige Verknüpfung der aromatischen Ringe in **br6** erklärt das Fehlen dieses Fragmentes im Massenspektrum.^[59]

Da die beiden Methylengruppen bei δ_H 2.56 und 3.14 und das einzelne Proton bei 6.53 keine Korrelationen zu den verbleibenden Kohlenstoffen aufweisen, wird wiederum auf Vergleichsspektren von Retipolid A (**57**) zurückgegriffen. Aufgrund der deutlichen Übereinstimmung mit den Daten von **br6** können die verbleibenden neun Kohlenstoffe bei δ_C 25.6, 35.8, 94.8, 127.4, 132.5, 144.1, 158.0, 164.4 und 203.5 einer zu **57** analogen Furanon-Pyran-Struktur zugeordnet werden. Der ähnliche Kurvenverlauf der CD-Spektren beider Verbindungen läßt auf die gleiche (*R*)-Konfiguration am Spiro-Kohlenstoff schließen. Der sich daraus ergebende Strukturvorschlag für **br6** ist mit dem von Steglich und Justus formulierten Biosyntheseweg der Retipolide gut vereinbar (siehe Kapitel 3.6.7). Darüberhinaus werden Kraftfeldrechnungen durchgeführt, wobei die mit „MacroModel“ berechnete energieärmste Konformation alle NOE-Effekte bestätigt.^[95]

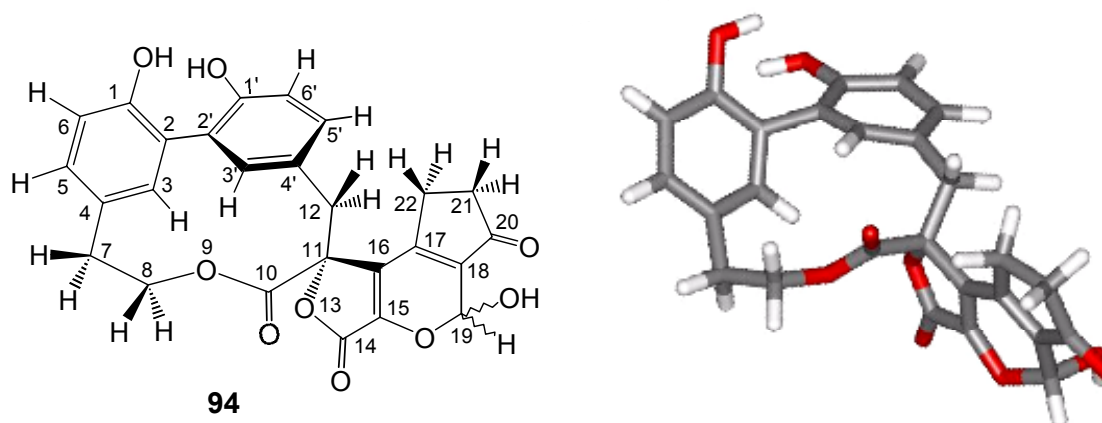


Abbildung 77: Strukturvorschlag für **94** und mit „MacroModel“ berechnete Konformation

Die starke Verbreiterung des Signals bei δ_C 94.8 erklärt sich durch die schnelle Umwandlung des Hemiacetals in das andere Diastereomer. Diese Umlagerung verläuft über die offene Aldehydform **95** und verursacht die in den Spektren beobachtete Verdopplung der Signale. Eine Übersicht aller NMR-Daten geben folgende Tabellen.

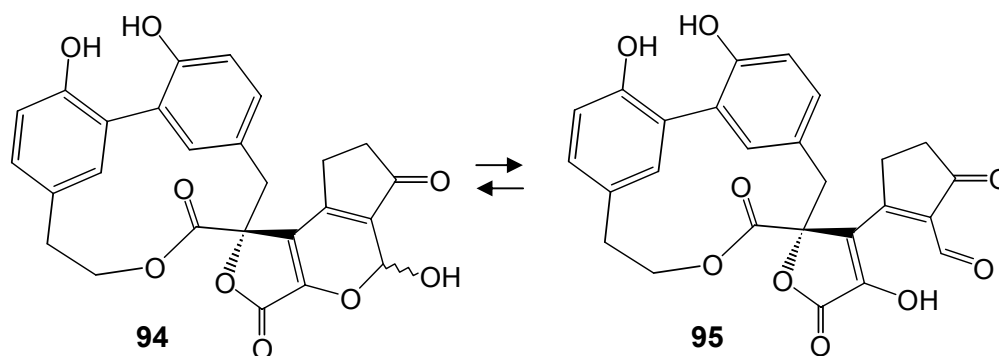


Abbildung 78: Halbacetalische und Aldehydform von **br6**

Tabelle 4: NMR-Daten und Kopplungen der Protonenspektren von Isoretipolid A (**94**)

δ_H [ppm], Integral	Multiplizität, 1H - 1H -Kopplung [Hz]	1H - 1H -COSY- Kopplungspartner δ_H [ppm]	1H - 1H -NOESY- Kopplungspartner δ_H [ppm]
2.56 2H	s, br	3.14	3.14
2.79 1H	d 16.3	3.24, 4.21, 5.03	3.24, 4.21, 7.06
3.03 1H	d 15.3	4.24	4.24, 7.05
3.14 2H	m	2.56	2.56, 6.53, 8.35*
3.24 1H	m	2.79, 4.21, 5.03	2.79, 7.31
4.21 1H	d, br 10.8	2.79, 3.24, 5.03	2.79, 5.03, 7.02
4.24 1H	d 14.4	3.03	3.03
5.03 1H	m	2.79, 3.24, 4.21	4.21, 7.31
6.53 1H	s, br		3.14
6.79 1H	d 8.1	7.06	7.06
6.83 1H	d 8.1	7.05	7.05
7.02 1H	s, br	4.24, 7.05	4.21, 7.05, 7.31
7.05 1H	dd 1.8, 7.8	6.83, 7.02	3.03, 6.83, 7.02
7.06 1H	dd 1.2, 8.1	6.79, 7.31	2.79, 6.79, 7.31
7.31 1H	s, br	7.06	3.24, 5.03, 7.02, 7.06
8.35 OH	s, br		3.14*

* Schwaches Korrelationssignal im NOESY-Spektrum

Tabelle 5: Zusammenstellung der NMR-Werte von **94**

C-Atom	δ_C [ppm]	$^1J_{CH}$ -Kopplung δ_H [ppm]	$^nJ_{CH}$ -Kopplung (HMBC) δ_C [ppm]
C-22	25.6	3.14	35.8
C-7	32.2	2.79	129.2, 130.8, 140.6
		3.24	70.1, 129.2, 130.8, 140.6
C-21	35.8	2.56	
C-12	41.2	3.03	87.7, 126.8, 130.4, 139.2, 171.4
		4.24	127.4, 130.4, 139.2, 171.4
C-8	70.1	4.21	32.2, 87.7, 130.8, 171.4
		5.03	32.2, 130.8, 171.4
C-11	87.7		
C-19	94.8	6.53	
C-6	115.3	6.79	127.5, 130.8, 140.6, 153.6
C-6'	115.9	6.83	126.8, 128.0, 139.2, 153.6
C-4'	126.8		
C-16	127.4		
C-2	127.5		
C-2'	128.0		
C-5	129.2	7.06	32.2, 127.5, 140.6, 153.6
C-5'	130.4	7.05	41.2, 139.2, 153.6
C-4	130.8		
C-15	132.5		
C-3'	139.2	7.02	41.2, 127.5, 130.4, 153.6
C-3	140.6	7.31	32.2, 128.0, 129.2, 153.6
C-18	144.1		
C-1	153.6		
C-1'	153.6		
C-17	158.0		
C-14	164.4		
C-10	171.4		
C-20	203.5		

3.6.7 Biosynthese von Isoretipolid A (94)

Der Strukturvorschlag für **94** steht in guter Übereinstimmung mit dem Biosynthesevorschlag der Retipolide.^[61] Dabei entsteht durch aldolartige Verknüpfung von zwei Molekülen *p*-Hydroxybrenztraubensäure (**46**) die Anhydro(bis-*p*-hydroxyphenylbrenztraubensäure) (**93**). Durch Veresterung mit Tyrosol (**91**), ebenfalls entstanden aus **46**, entsteht daraus *seco*-Retipolid E (**62**), die Ausgangsverbindung von Isoretipolid A (**94**) und den anderen Retipoliden. An dieser Stelle teilt sich der Biosyntheseweg: Während die weiteren Pigmente der Gruppen 2 und 3 (nach Hellwig) ausschließlich durch oxidative C-O-Verknüpfung der beiden aromatischen Ringe entstehen, beschreiten die Vertreter der Gruppe 1 einen weiteren Syntheseweg durch direkte C-C-Verknüpfung der beiden Arylreste.^[59] Diese Variante in der Biosynthese ist als eindeutiges chemotaxonomisches Unterscheidungsmerkmal der verschiedenen Gruppen von *B. retipes/ornatipes* zu werten.

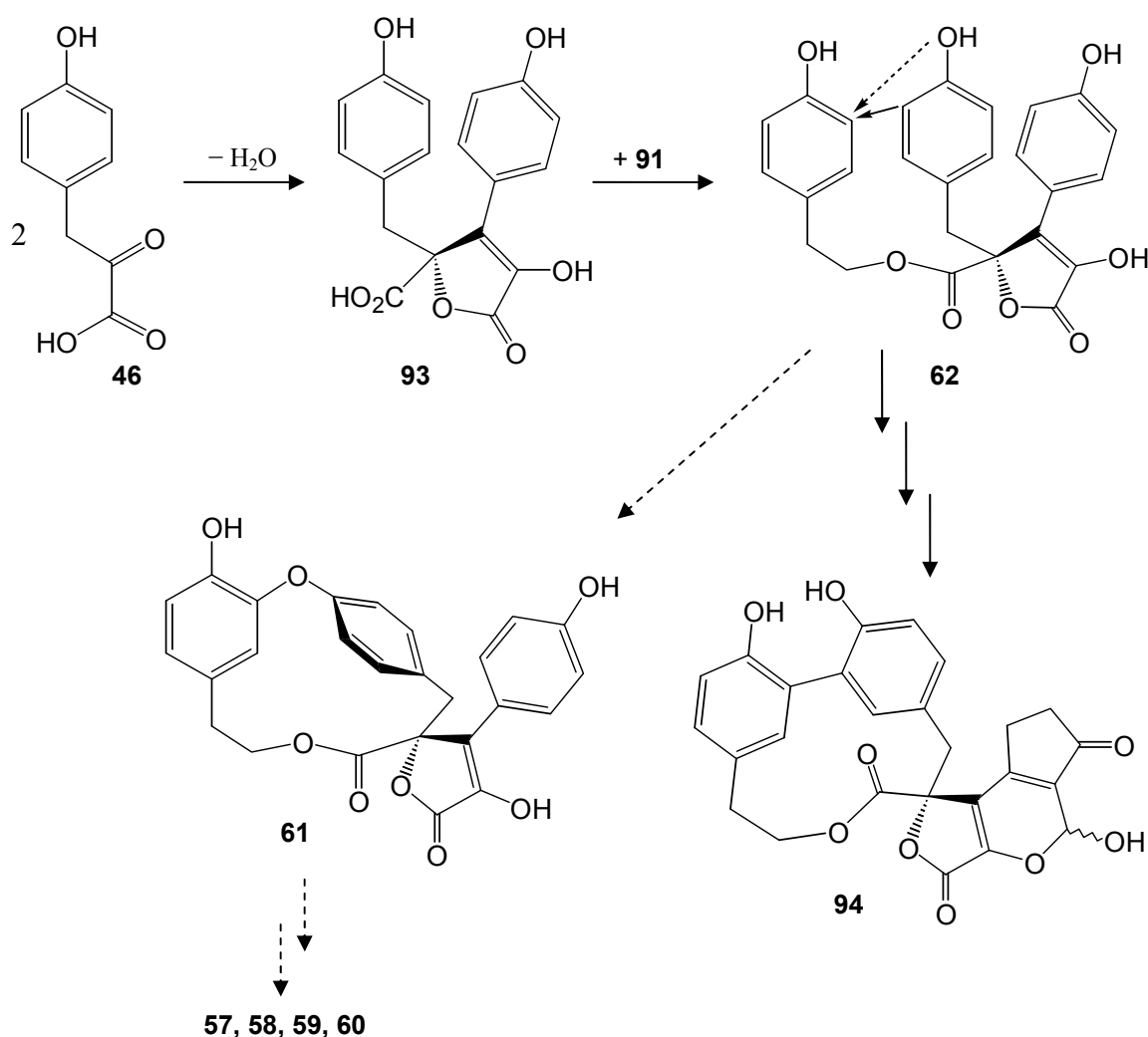


Abbildung 79: Biosyntheschema von Retipolid A (**57**) und Isoretipolid A (**94**)

3.6.8 Isoretipolid A-Methoxyfulven

Zur Bestätigung der Struktur wird **94** zum Methoxyfulven umgesetzt.^[61] Dazu werden 0.6 mg des Naturstoffes in 3 Tropfen Methanol gelöst, mit 1 ml *p*-Toluolsulfonsäure (1% in Dimethoxypropan) versetzt und 25 Minuten bei 75° C refluxiert. Das Lösungsmittel wird entfernt und der Rückstand über Kieselgel mit einem Gemisch aus Ethylacetat und Petrolether im Verhältnis 1:1 aufgetrennt. Man erhält 0.3 mg eines orangefarbenen Öles mit dem R_f -Wert 0.4. Der Molekülpeak im EI-MS bei $m/z = 472$ $[M]^+$ mit der Zusammensetzung $C_{27}H_{20}O_8$ entspricht der Verbindung **96**.

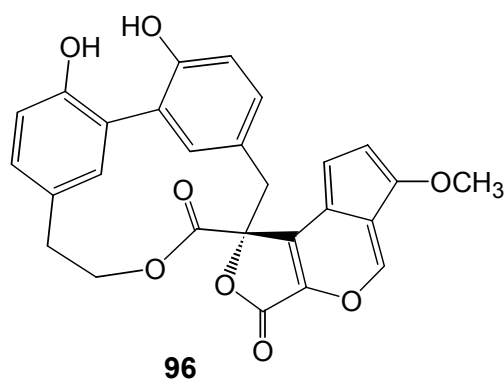


Abbildung 80: Isoretipolid A-Methoxyfulven (**96**)

3.6.9 Versuche zur Isolierung von Ornatipolid

Im Rahmen seiner Totalsynthese stellte Justus ein makrocyclisches Ketolacton **97** her.^[61] Von Shibata konnte aus frischen Pilzfruchtkörpern von *B. ornatipes* das unmethylierte Derivat Ornatipolid (**98**) isoliert werden.^[96]

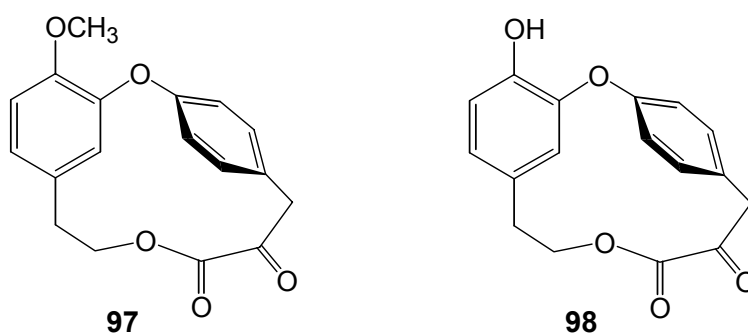


Abbildung 81: α -Ketolacton (**97**) und Ornatipolid (**98**)

Eigene Untersuchungen zeigen jedoch, daß weder in amerikanischen Exemplaren noch in japanischen Kollektionen **98** zu detektieren war.

Zur Extraktion wird sowohl Methanol, als auch Aceton und Ethylacetat verwendet. Die so erhaltenen Rohextrakte werden nach der Methode von Shibata aufgetrennt. Außerdem wird auch eine Trennung an RP 18 Material mittels HPLC versucht. Als Vergleich steht synthetisches **98** zur Verfügung, hergestellt aus **97**.^[59,61] Es kann jedoch kein Ornatipolid (**98**) nachgewiesen werden. Möglicherweise liegt die Verbindung nur in frischen Pilzen vor, so daß der Nachweis in getrockneten Exemplaren nicht möglich ist. Die Extraktion der Pilze mit Methanol und die Trennung über Kieselgel, wie von Shibata beschrieben, könnte jedoch auch zur Bildung von Artefakten führen.^[96]

Als problematisch bei der Aufarbeitung erweist sich auch der gleiche R_f -Wert von Ergosterol und **98** unter diesen Trennbedingungen.

3.7 *Boletus longicurvipes* Snell & Smith

3.7.1 Pilzbeschreibung

Der Pilz *Boletus longicurvipes* Snell & Smith (curved-stalked Bolete) oder auch *Leccinum longicurvipes* ist im Osten Nordamerikas verbreitet. Der Pilz ist relativ klein, der anfangs stumpf gewölbte, später flache Hut wird nur 1.5 bis 6 cm groß. Die zähe, klebrige Huthaut ist orangerot, gelbbraun oder schmutzig ockerfarben gefärbt, im Alter auch oliv. Die Röhren und Poren sind blaßgelb, mit zunehmender Reife auch schmutzig-grünlichgrau. Der Stiel ist 5 bis 9 cm lang, meist nur 8 bis 15 mm dick, zylindrisch, weiß bis gelblich und besitzt eine rauhe, strukturierte Oberfläche, deren Schuppen sich im Alter oder bei Trocknung rötlich färben. Das Fleisch ist cremefarben oder blaßgelb, mild im Geruch und Geschmack und ändert bei Verletzung nicht die Farbe.^[76]

Die Pilze *Boletus subglabripes* Peck und *Boletus rubropunctus* Peck können trotz großer Ähnlichkeit mit *Boletus longicurvipes* eindeutig anderen Arten zugerechnet werden.



Abbildung 82: *Boletus longicurvipes*^[80]

3.7.2 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen einer Pilzexkursion in den Osten der USA wurde bei diesem Pilz eine Farbreaktion mit konz. Kalilauge entdeckt. Bei Benetzung der Oberfläche färbt sich der Stiel leuchtend chromgelb, die Huthaut hingegen kräftig kirschrot. Die Verbindungen, die diese Reaktionen hervorrufen, sollen isoliert und charakterisiert werden.

3.7.3 Extraktion des Stielfarbstoffes

Da es sich offensichtlich um zwei verschiedene Verbindungen handelt, die diese Farbreaktionen hervorrufen, werden die Pilzstiele von den Kappen abgetrennt und separat aufgearbeitet.

Um einen Großteil der Fette zu entfernen, werden die Stiele im Ganzen 30 min mit Petrolether geschüttelt, die trübe Lösung wird verworfen. Die Pilzfüße werden zerkleinert und mit schwach salzsaurem Aceton unter Schutzgasatmosphäre mehrmals extrahiert, bis die Extraktionsreste mit Lauge keine Reaktion mehr zeigen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und die braune, zähe Masse zwischen Ethylacetat und Wasser verteilt. Nach Trocknung und Entfernen des Lösungsmittels wird der verbleibende Rückstand in wässrigem Methanol aufgenommen und durch Gelchromatographie an Sephadex[®] LH 20 mit Methanol/Wasser 7:3 als Eluent aufgetrennt. Um die Bildung schwerlöslicher Salze zu verhindern, werden zum Rohextrakt noch zwei Tropfen verdünnter Salzsäure zugegeben. Man erhält drei Fraktionen, die durch analytische HPLC an RP 18 untersucht werden.

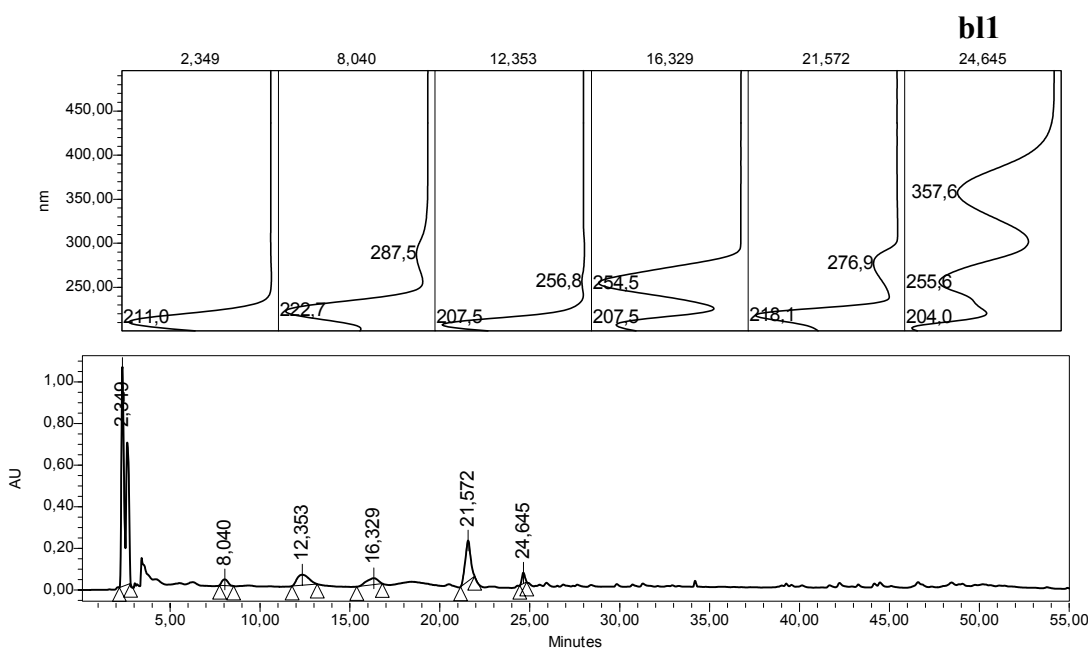


Abbildung 83: HPL-Chromatogramm der zweiten Sephadex-Fraktion von *B. longicurvipes*

Die erste, braungefärbte Fraktion enthält ein an RP 18 untrennbares Substanzgemisch, vermutlich Oxidationsprodukte. Der Hauptbestandteil der zweiten, goldgelben Fraktion ist eine hellgelbe Substanz, die sich mit Kalilauge chromgelb verfärbt.

Die letzte, rötlichbraune Fraktion besteht überwiegend aus Ergosterol, das durch dünnschichtchromatographischen Vergleich mit authentischer Substanz identifiziert wird.

Aus der zweiten Fraktion kann durch wiederholte Chromatographie an Sephadex[®] LH 20 und präparative HPLC an RP 18 ein gelber Feststoff erhalten werden.

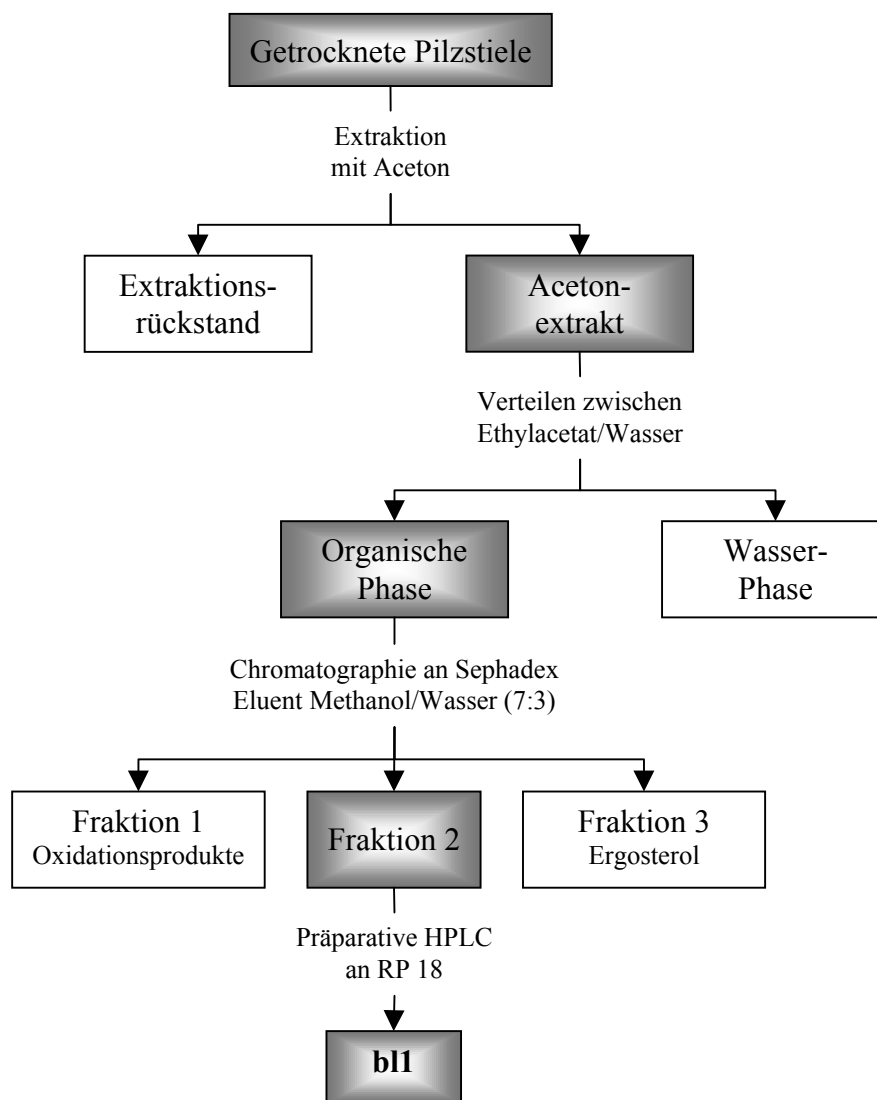


Abbildung 84: Isolierung von **b11** aus *Boletus longicurvipes*

3.7.4 Strukturaufklärung

Die gelbe Substanz ist in Aceton gut löslich. Im stark Basischen verfärbt **bl1** sich chromgelb, während konzentrierte Schwefelsäure eine Grünfärbung bewirkt. Längeres Erhitzen führt zu einer Blaufärbung. Diese Reaktion ist sonst nur von Gyrocyanin (**35**) bekannt^[45], der dünnschichtchromatographische Vergleich zeigt jedoch, daß es sich um eine andere Verbindung handeln muß.

Auch das Absorptionsspektrum besitzt große Ähnlichkeit mit dem von Gyrocyanin (**35**).^[45] Neben den Absorptionsmaxima bei 204 und 256 nm weist die Verbindung noch ein Absorptionsmaximum bei 358 nm auf.

Das IR-Spektrum zeigt neben einer starken OH-Valenzschwingung bei 3436 cm^{-1} eine schmale Doppelbande im Valenzschwingungsbereich von Carbonylgruppen bei 1682 und 1680 cm^{-1} . Die für CO-Einfachbindungen charakteristischen Valenzschwingungen überlagern sich teilweise und erscheinen bei 1211 , 1188 und 1138 cm^{-1} .

Das EI-Massenspektrum zeigt keinen Molekülpeak. Neben dem Basispeak mit der Masse m/z 268 $[\text{M}-\text{CO}_2]^+$ und der Zusammensetzung $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$ ist noch ein weiteres Molekülfragment bei m/z 296 mit der Zusammensetzung $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_5$ zu sehen.

Das ^1H -NMR-Spektrum von **bl1** ist sehr einfach. Im Bereich der aromatischen Protonen bei δ_{H} 6.83, 6.98, 7.33 und 8.25 sieht man vier Signale für je zwei Protonen, die alle zu einem Dublett aufspalten. Unter Berücksichtigung der Kopplungskonstanten von $^3J_{\text{HH}}$ 8.4 bzw. 9.0 Hz können sie anhand des ^1H - ^1H -COSY-Spektrums zwei AA'BB'-Spinsystemen zugeordnet werden.

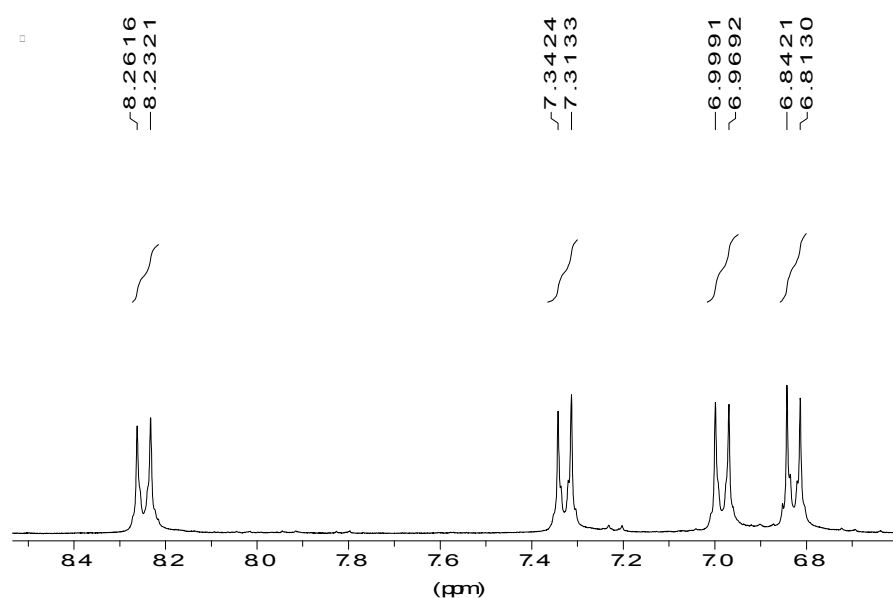


Abbildung 85: Ausschnitt des ^1H -NMR-Spektrums von **bl1** (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{Aceton}$)

Im ^{13}C -Experiment sind nur dreizehn Signale zu sehen, da durch die Symmetrie beider Ringe jeweils zwei Signale zusammenfallen, zu erkennen an einer deutlichen Erhöhung dieser Signale. Von den verbleibenden fünf Kohlenstoffen erscheinen zwei im Bereich für Carbonylgruppen bei δ_{C} 197.4 und 199.5.

Aufgrund der bisher festgestellten Ähnlichkeit mit **35** werden NMR-Spektren von Gyrocyanin (**35**) zum Vergleich herangezogen.^[45] Sowohl die ^1H -NMR- als auch die ^{13}C -NMR-Spektren zeigen große Übereinstimmungen. Anders als bei Gyrocyanin fehlt bei **bl1** das Signal des isolierten Protons am Cyclopentenonring in Position 5. Das Signal des Kohlenstoffs C-5 ist bei **bl1** im Vergleich zu **35** durch die Bindung an ein elektronegatives Heteroatom deutlich tieffeldverschoben. Es handelt sich bei **bl1** also um Gyroporin (**39**), das Oxidationsprodukt des Gyrocyanins (**35**). Der Vergleich mit Literaturwerten bestätigt dies.^[44,45]

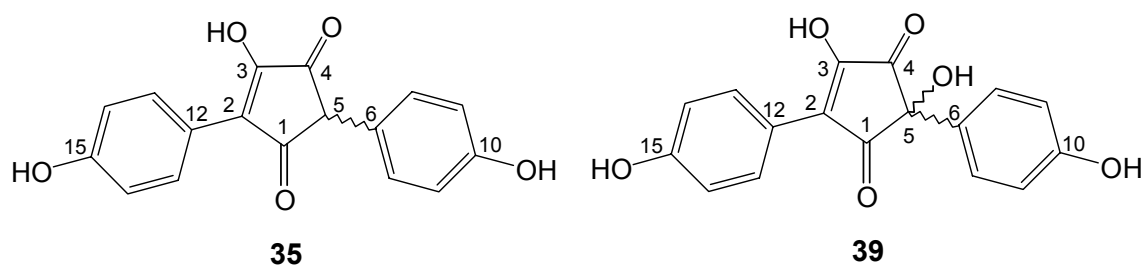


Abbildung 86: Gyrocyanin (**35**) und Gyroporin (**39**)

3.7.5 Versuche zur Isolierung der zweiten Verbindung

Die Verbindung, die mit Kalilauge die kirschrote Farbreaktion hervorruft, ist in der Huthaut enthalten. Zur Isolierung werden die Kappen pulverisiert und erst mit Aceton, dann mit Methanol extrahiert. Es ist jedoch weder dünnschichtchromatographisch noch direkt aus dem Extrakt eine Verbindung zu detektieren, die im Basischen rot färbt. Auch bei einer Extraktion der abgeschälten Huthaut kann weder mit unpolaren noch sehr polaren Lösungsmitteln wie DMSO eine rotfärbende Substanz in Lösung gebracht werden. Vermutlich liegt die Substanz im getrockneten Pilz als schwerlösliches Salz vor, das selbst mit Wasser oder Säure nicht in Lösung geht, wie die Kontrolle der Pilzreste mit Lauge zeigt. Eine Extraktion aus frischen Exemplaren mit Methanol oder Aceton könnte hingegen gelingen.

Keiner der Extrakte aus den Kappen enthält weitere 2,5-Diarylcyclopentenonderivate. Das Vorkommen von Gyroporin (**39**) ist also strikt auf den Stiel beschränkt.

3.7.6 Untersuchungen zu weiteren Cyclopentenonderivaten

Gyrocyenin (**35**) wird sehr leicht zu Gyroporin (**39**) oxidiert, oft schon bei dünnschichtchromatographischer Untersuchung an Kieselgel.^[16] Deshalb wird untersucht, ob nicht die umfangreiche Aufarbeitung der Pilze zur Entstehung von **39** geführt hat und im Pilz nicht auch Gyrocyenin (**35**) enthalten ist.

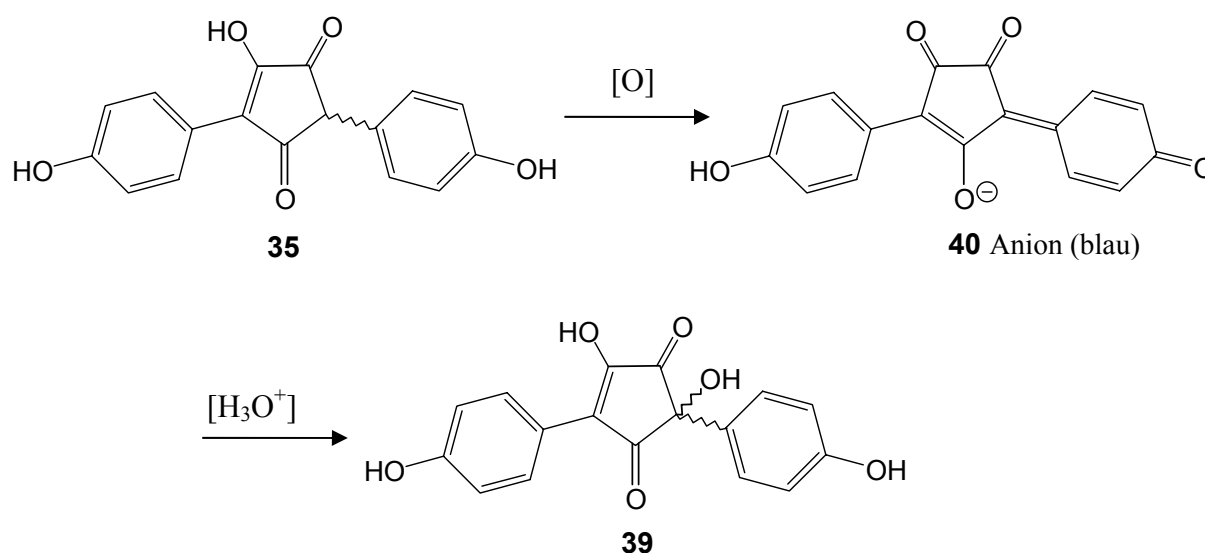


Abbildung 87: Oxidation von Gyrocyenin (**35**) zum Gyroporin (**39**)^[16]

Dazu wird ein einzelner Stiel in Petrolether entfettet, zerkleinert und mit Aceton unter Argon extrahiert. Zur Vermeidung von Oxidationen wird eine Spatelspitze Ascorbinsäure zugesetzt. Die Lösung wird bis zur Trockene eingedunstet, in Acetonitril gelöst und über Kartusche gefiltert. Anschließend wird die Zusammensetzung des Extraktes mittels analytischer HPLC an RP 18 untersucht. Zum Vergleich werden auch die potentiellen Biosynthesevorläufer (–)-Involutin (**36**), (–)-Chamonixin (**37**) und Gyrocyenin (**35**) unter gleichen Bedingungen gemessen.

Wiederum können weder Gyrocyenin (**35**) noch andere, strukturverwandte Verbindungen detektiert werden.

Sichere Aussagen können aber auch hier nur nach Untersuchung frischen Materials getroffen werden, da die Trocknung der Pilze bereits zur vollständigen Oxidation von **35** führen kann. Aufgrund seines Verbreitungsgebietes Nordamerika ist die Beschaffung von frischem Material schwierig. Da der Pilz aber als nicht bläuernd beschrieben wird, ist **35** wahrscheinlich nicht oder nur in geringen Spuren vorhanden.^[76]

3.7.7 Diskussion des Ergebnisses

Außer in *Gyroporus cyanescens* ist Gyroporin (**39**) auch innerhalb der Gattung *Leccinum* häufiger anzutreffen. So wurde es bereits in *L. eximum*, *L. oxydabile*, *L. scabrum* und *L. testaceascabrum* identifiziert.^[18] In der Art *Leccinum aurantiacum* konnte neben **39** auch die reduzierte Form, das Gyrocyanin (**35**) und verschiedene Pulvinsäurederivate nachgewiesen werden. Die Einteilung in verschiedene Gruppen aufgrund ihrer unterschiedlichen Pigmentsysteme ist bei der Sektion *Leccinum* nicht unproblematisch, da sowohl Pulvinsäuren als auch Diarylcyclopentenone aus gleichen Ausgangsverbindungen gebildet werden. In Kulturen kommt es daher manchmal zum Wechseln der Stoffwechselwege.^[16,18]

Binder untergliedert die bisher bestehende Gattung *Leccinum* in die Sektionen *Leccinum* s. str., *Luteoscabrum* und *Pseudoleccinum*.^[74] Die cyclopentenonproduzierenden Arten werden aufgrund ihrer blassen Fleischfärbung und den tintenblauen Anlauffarben zur Sektion *Leccinum* gestellt. *Boletus longicurvipes* hingegen wird von Binder aus dieser Sektion ausgenommen und aufgrund seines Aussehens und basierend auf DNA-Sequenzanalysen zur Sektion *Pseudoleccinum* gestellt. Kennzeichen der Pilze dieser Sektion sind die Produktion von Pulvinsäuren und dadurch gelbgefärbtes Fleisch, jedoch ohne Blaufärbung.^[74]

Im Rahmen dieser Untersuchung werden auch von den anderen Arten dieser Sektion, *B. subglabripes* Peck und *B. rubropunctus* Peck, analytische HPLC-Vergleichsuntersuchungen durchgeführt. Die acetonischen Extrakte dieser Pilze enthalten jedoch nur Pulvinsäuren und keine Diarylcyclopentenonderivate.

In *Boletus longicurvipes* hingegen können keine Farbstoffe des Pulvinsäuretyps nachgewiesen werden. Allein vom pigmentchemischen Gesichtspunkt müßte diese Art der Sektion *Leccinum* näher stehen und daher auch als *Leccinum longicurvipes* bezeichnet werden.

3.8 Brasilianische Röhrlinge

3.8.1 *Boletinellus rompelii* (Pat. & Rick) Watling

Boletinellus rompelii (Pat. & Rick) Watling, (= *Gyrodon rompelii* (Pat. & Rick) Singer) ist im brasilianischen Laub- und Regenwald verbreitet.

Er wächst dort auf lebenden oder toten Bäumen oder an Abhängen, oft an nahezu senkrechten Oberflächen. Der anfangs gewölbte, dann abgeflachte, dickfleischige Pilzhut erreicht eine Größe von 2 bis 22 cm. Die glatte Oberfläche ist gleichmäßig dunkelbraun, nach langem Regen auch gelbbraun aufgehellt und leicht klebrig. Die Röhren sind 2-8 mm lang, die Poren mittelgroß und zunächst gelb, später oliv gefärbt. Der glatte, zylindrische oder leicht bauchige Stiel wird bis zu 11 cm lang und bis 30 mm dick. Auch er ist gleichmäßig dunkelbraun gefärbt, sein Fleisch ist weiß, fest, mit mildem Geschmack. Der gesamte Pilz zeigt starke Blaufärbung bei Verletzung.^[97]



Abbildung 88: *Boletinellus rompelii*^c

3.8.2 *Boletinellus exiguus* (Singer & Digilio) Watling

Der Pilz *Boletinellus exiguus* (Singer & Digilio) Watling (= *Gyrodon exiguus* Singer & Digilio) kommt nur im unberührten, tropischen Regenwald vor.

Der Pilz ist blassgelb, gelb oder ockerfarben, der bis zu 7 cm große Hut ist flach oder leicht gewölbt und nierenförmig. Die Hutoberfläche ist matt, feinfilzig bis flockig und trocken. Die kurzen Röhren und Poren sind gelblichweiß, später mehr ins rötlich-braune übergehend. Der Stiel ist bis zu 15 mm lang, zylindrisch und fest, mit glatt-samtiger Oberfläche. Die Stielbasis ist schwarzbraun gefärbt, zur Spitze hin rötlich oder oliv-braun. Bei Beschädigung verfärbt sich das weiche, weiße Fleisch des Pilzes schnell blau.^[97]

^c Ich danke Herrn Dr. Lang für die Anfertigung der Fotografie.

3.8.3 Bisherige Arbeiten und Ziel dieser Untersuchung

Die Gattung *Boletinellus* (*Gyrodon*) wurde bereits mehrmals im Rahmen systematischer Arbeiten untersucht. Aufgrund ihres waben- oder labyrinthartigen Hymenophors wurden die Arten innerhalb der Familie der *Gyrodontaceae* zusammengefasst, auch die Beziehung zu *Suillus* wurde nicht ausgeschlossen.^[14] Neueren Untersuchungen zufolge werden die dunkler gefärbten Arten in der Familie der *Boletinellaceae* Binder & Bresinsky innerhalb der *Sclerodermatineae* zusammengefasst, die sich genetisch und pigmentchemisch klar von den bei *Gyrodontaceae* verbleibenden Arten unterscheiden.^[98,99] Kennzeichen der Gattung *Gyrodon* ist das Vorkommen von (–)-Involutin (**36**) und (–)-Chamonixin (**37**), während *Boletinellus* Pulvinsäuren des Typs Variegatsäure (**17**) enthält. Pigmentchemisch wurden diese beiden Arten bisher noch nicht untersucht.

Die Pilze sollen auf ihre Inhaltsstoffe, insbesondere auf charakteristische Farbstoffe untersucht werden.

3.8.4 Aufarbeitung der Fruchtkörper

Teile der getrockneten Fruchtkörper werden zerkleinert und mit mehreren Lösungsmitteln steigender Polarität extrahiert. Eingesetzt wird Petrolether, Ethylacetat, Aceton, Methanol und leicht salzsaures Methanol. Die Extrakte werden bis zur Trockene eingeeengt und nach Festphasenextraktion mittels analytischer HPLC an RP 18 untersucht. Farbige Verbindungen werden, je nach vorliegender Menge, durch Coinjektion, Massenspektrometrie oder ¹H-NMR-Spektroskopie identifiziert.

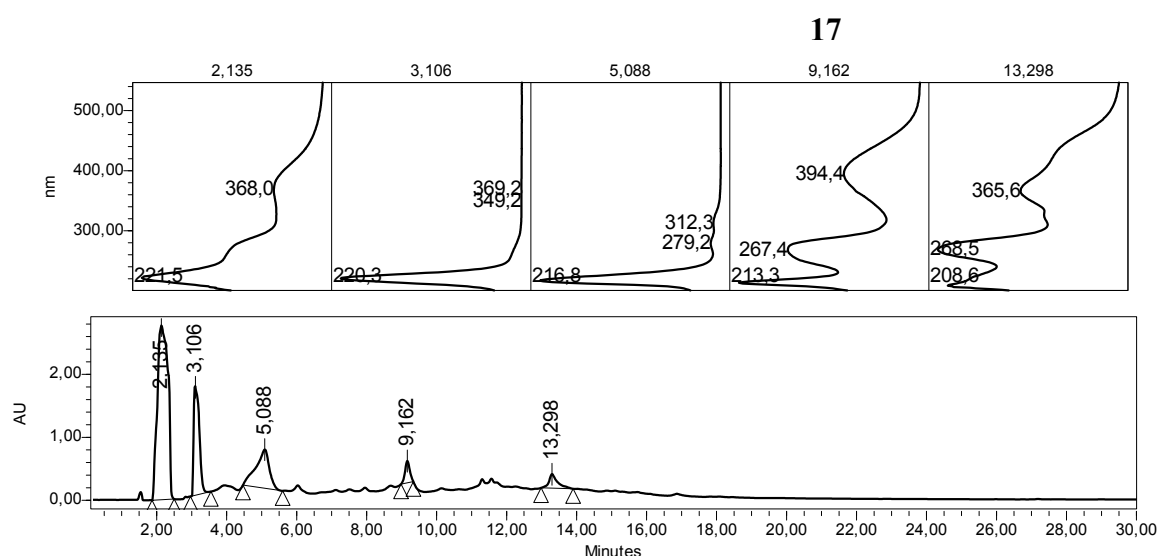


Abbildung 89: HPL-Chromatogramm des Rohextraktes von *Boletinellus rompelii*

3.8.5 Farbstoffe aus *Boletinellus rompelii*

Der Acetonextrakt von *Bol. rompelii* ist kräftig gelb gefärbt. Das HPL-Chromatogramm zeigt eine gelbe Hauptverbindung, die sich als identisch mit Variegatsäure (**17**) erweist. Die Nebenverbindung weist ein dem Norbadion A (**30**) sehr ähnliches UV/VIS-Absorptionsspektrum auf. Die Coinjektion mit Norbadion A (**30**) und den beiden Nebenzpigmenten **beb1** und **beb3** aus *Boletus erythropus* zeigt, daß es sich um die Verbindung **beb3** handelt. Eine sichere Aussage dazu kann jedoch aufgrund der geringen Materialmenge nicht gegeben werden.

Die Petrolether- und Ethylacetatphasen enthalten keine farbigen Verbindungen, während in den methanolischen Lösungen die gleichen Farbstoffe zu detektieren sind, wie im Acetonextrakt.

3.8.6 Farbstoffe aus *Boletinellus exiguus*

Diese Art enthält die gleichen Pigmente wie *Boletinellus rompelii*. Auch hier ist **17** das Hauptpigment, gefolgt von der zweiten, nur in Spuren zu detektierenden Verbindung.

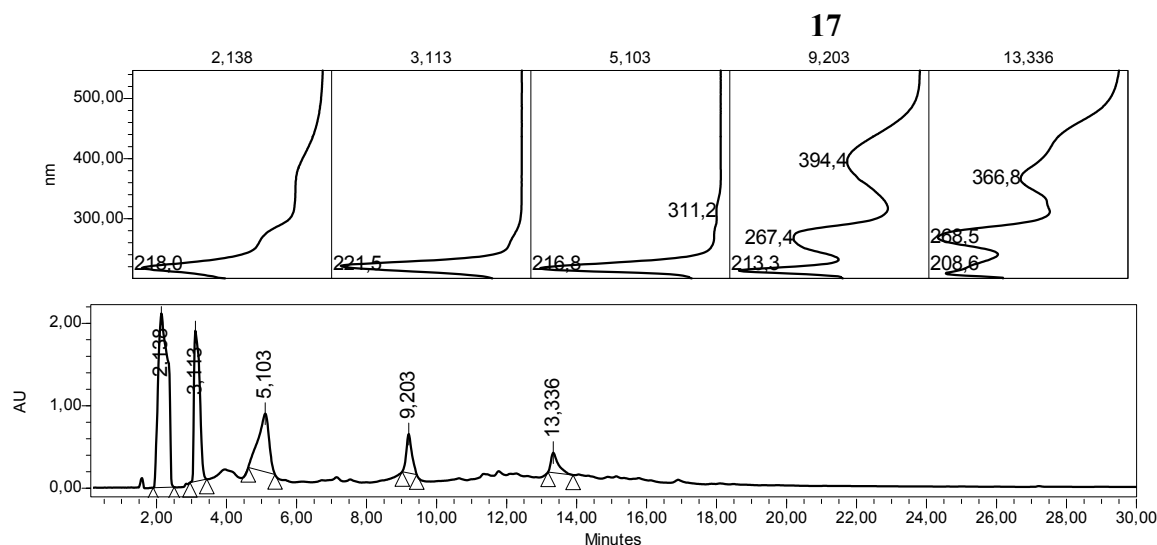


Abbildung 90: HPL-Chromatogramm des Extraktes von *Boletinellus exiguus*

3.8.7 Auswertung der HPLC-Untersuchung

Die beiden tropischen Arten *Boletinellus rompelii* und *Boletinellus exiguus* gliedern sich durch das Vorkommen von Variegatsäure (**17**) gut in die Gattung *Boletinellus* ein. Die Trennung dieser Arten von *Gyrodon* wird aus pigmentchemischer Sicht bestätigt, ebenso die sequenzanalytisch nachgewiesene enge Beziehung zur Unterordnung der *Sclerodermatineae*, innerhalb derer auch Pulvinsäurederivate anzutreffen sind.^[98,99]

3.9 *Calostoma cinnabarinum* Corda

3.9.1 Beschreibung des Pilzes



Abbildung 91: *Calostoma cinnabarinum*^[80]

Der Pilz *Calostoma cinnabarinum* Corda (red slimy-stalked Puffball) zählt zu den *Gastromyceten*. Der kugel- bis eiförmige Fruchtkörper wird 0.5 bis 2 cm groß und ist umgeben von einer mehrschichtigen Peridie. Die Exoperidie ist zu einer durchsichtigen, gallertartigen Schicht umgebildet, die sich im Reifungsprozeß zersetzt und zerfällt. Die Endoperidie ist dünn, anfangs leuchtend orangerot gefärbt und verblaßt später zu hellorange oder gelb. Im reifen Zustand bildet sich eine kreuzförmige, apikale Mundöffnung, durch die die leuchtend gelb gefärbten Sporen austreten. Der zunächst auf dem Boden aufsitzende Pilz wird während des Reifeprozesses durch einen bis zu 4 cm langen, bis 2 cm breiten, stark gerieften, netz- oder schwammartigen Stiel aus Hyphen emporgehoben. Dieser Stiel ist im jungen Zustand ebenfalls von einer gelatineartigen Schicht umgeben, seine Farbe variiert von zinnoberrot bis ockerfarben und verbleicht ebenfalls mit zunehmendem Alter.

Der Pilz wächst vom Spätsommer bis in den Herbst einzeln oder in kleinen Gruppen auf humosen Boden. Als Standort bevorzugt er Anhöhen im Wald, Wegränder oder einzeln stehende Bäume im Süden und Osten der USA und im asiatischen Raum. In Europa ist diese Gattung nicht zu finden.^[74,100]

3.9.2 Bisherige Erkenntnisse

Über den Farbstoff aus *Calostoma cinnabarinum* sind bisher keine Arbeiten bekannt.

Umfangreiche systematische Untersuchungen auf molekularbiologischer Basis führten zu einer Einordnung des Pilzes in die neue Unterordnung der *Sclerodermatineae* Binder & Bresinsky.^[74,98]

3.9.3 Isolierung des Farbstoffes

Da der Pilz mit zunehmendem Alter an Farbe verliert, wird vermutet, daß der Farbstoff sehr oxidationsempfindlich ist. Die gesamte Aufarbeitung wird daher unter Lichtausschluß und Schutzgasatmosphäre (Argon) durchgeführt.

Von den luftgetrockneten Pilzen werden die cremefarbenen Stiele entfernt, die roten Fruchtkörper grob zerkleinert und mehrmals mit Essigsäureethylester extrahiert. Die leuchtend gelben Extrakte werden bei Raumtemperatur etwas eingeeengt und mehrmals mit leicht salzsaurem Wasser gewaschen. Nach Trocknung der organischen Phase über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel entfernt.

Versuche, den Rückstand durch Chromatographie an Sephadex[®] LH 20, Kieselgel bzw. RP-Material aufzutrennen, scheitern an der geringen Löslichkeit der Verbindung. Zur weiteren Reinigung wird der verbleibende Rückstand nun mehrmals mit Petrolether und Petrolether/Ethylacetat (1:1) gewaschen, um Fette und andere unpolare Bestandteile zu entfernen. Dabei färben sich die Waschlösungen hellgelb. Zurück bleibt ein orangefarbener, schwer löslicher Feststoff **cc9**.

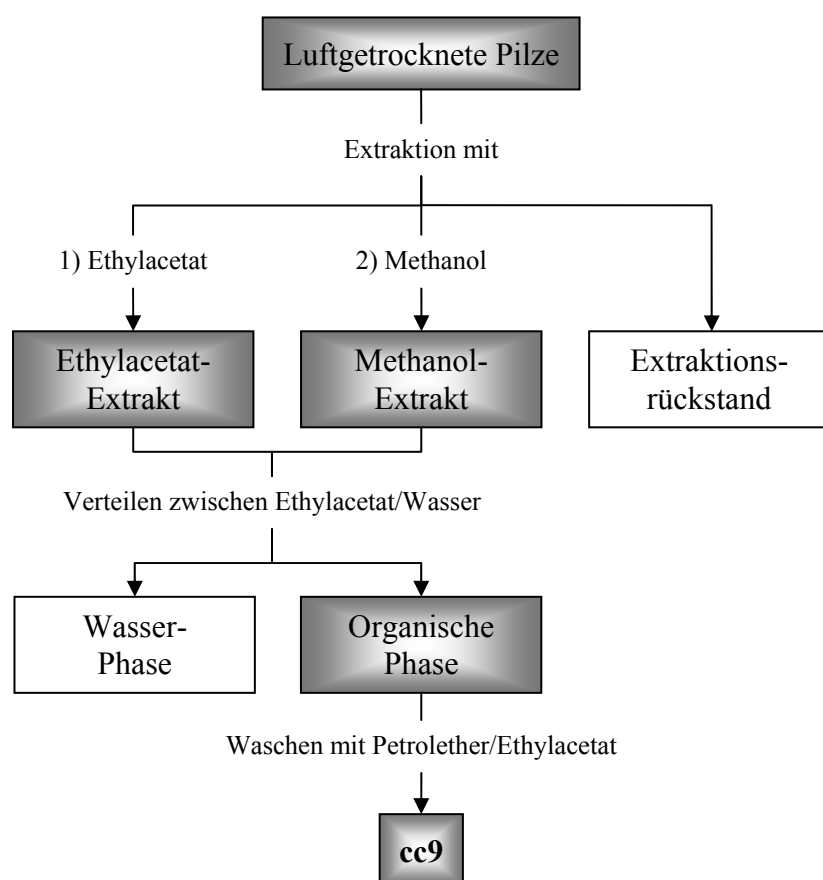


Abbildung 92: Isolierung von **cc9** aus *Calostoma cinnabarinum*

Um den in den harten Schalen der Fruchtkörper enthaltenen Farbstoff restlos herauszulösen, werden die noch immer rot gefärbten Extraktionsreste mit gereinigtem, geglähten Seesand in der Reibschale verrieben und anschließend mit Methanol erschöpfend extrahiert. Die methanolischen Extrakte werden bis zur Trockene eingeeengt, in Essigsäureethylester aufgenommen und wie oben beschrieben aufgereinigt.

Die Untersuchung mittels analytischer HPLC an RP 18 zeigt zwei identische Chromatogramme einer orangefarbenen Verbindung.

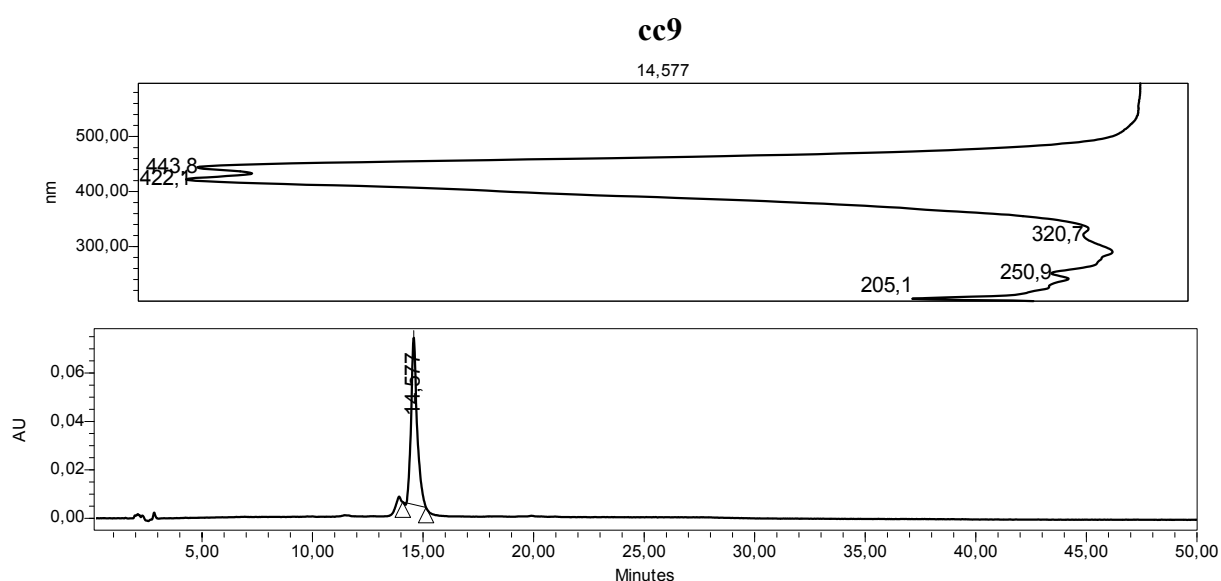


Abbildung 93: HPL-Chromatogramm des Methanolextraktes von *Calostoma cinnabarinum*

3.9.4 Strukturaufklärung

Außer der Farbreaktion mit konz. Schwefelsäure nach blaugrün, liefert auch das UV/VIS-Spektrum von **cc9** Hinweise auf eine carotinoide oder polyen-ähnliche Struktur. Die beiden Absorptionsmaxima bei 422 und 444 nm entsprechen sieben oder acht konjugierten Doppelbindungen.^[101]

Das IR-Spektrum zeigt im Valenzschwingungsbereich von CO- und konjugierten CC-Doppelbindungen mehrere Banden bei 1588, 1620, 1639, 1665 und 1694 cm^{-1} . Die starken Absorptionsbanden bei 1013, 1112 und 1146 cm^{-1} kommen durch Valenzschwingungen von CO-Einfachbindungen zustande. Die breite Bande bei 3430 cm^{-1} wird durch OH-Valenzschwingungen verursacht, eine schmale Bande bei 2923 und 2853 cm^{-1} gibt Hinweis auf eine Aldehydgruppe.

Das EI-Massenspektrum zeigt einen Molekülpeak mit m/z 256 $[M]^+$, was einer Zusammensetzung von $C_{16}H_{16}O_3$ entspricht. Der Masseverlust von 29 deutet auf die Abspaltung einer Aldehydgruppe hin.

Obwohl sich die Substanz in fast allen gängigen Lösungsmitteln mit kräftig gelber Farbe zu lösen scheint, reicht die vorliegende Konzentration nicht aus, um aussagekräftige NMR-Spektren zu erhalten oder eine weitere Aufreinigung durchzuführen.

Erst durch Derivatisierung der im Molekül enthaltenen funktionellen Gruppen kann die Löslichkeit der Verbindung erhöht und so eine Reinigung und Messung ermöglicht werden. Für empfindliche Verbindungen eignen sich vor allem Silylierung mit MSTFA und Methylierung mit Diazomethan.

3.9.5 Silylierung von cc9

Ein Teil des gereinigten Extraktes wird mit *N*-Methyl-*N*-trimethylsilyl-trifluoracetamid silyliert. Da Trimethylsilylether hydrolyseempfindlich sind, wird auf eine Reinigung des Rohproduktes verzichtet. Die Signale der Verunreinigungen stören nicht bei der Strukturaufklärung.

Vom Silylierungsprodukt **99** kann jedoch kein aussagekräftiges Massenspektrum erhalten werden.

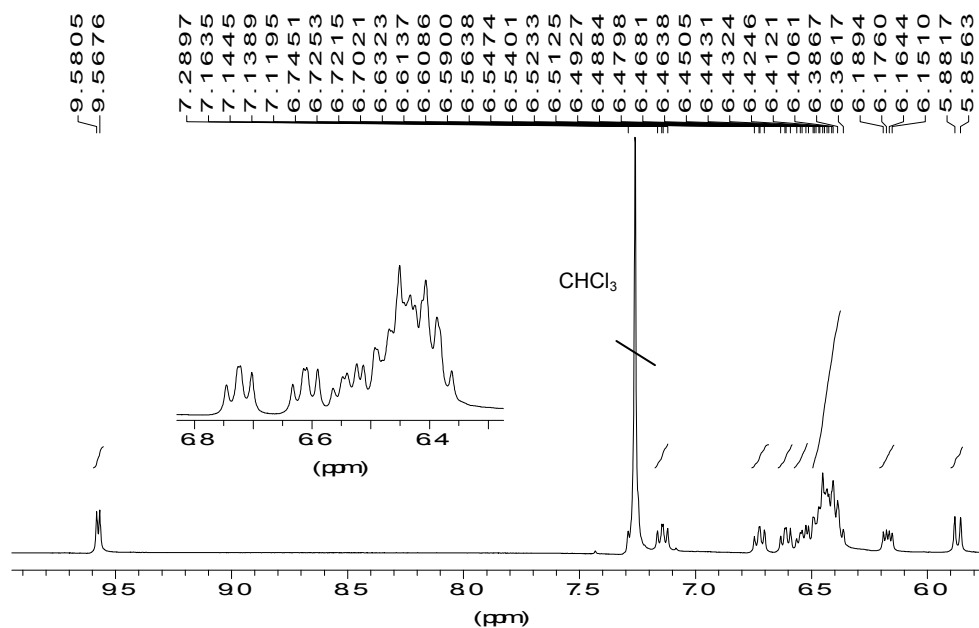


Abbildung 94: ^1H -NMR-Spektrum vom Silylierungsprodukt **99** (600 MHz, CDCl_3)

Im Protonenspektrum ist das Signal der Trimethylsilylgruppe nicht zu sehen, da der Meßbereich oberhalb von δ_{H} 0.2 beginnt. Das Signal einer Aldehydgruppe bei δ_{H} 9.57 erscheint als Dublett mit der Kopplung $^3J_{\text{HH}}$ 8.0 Hz, woraus man auf eine α,β -ungesättigte Struktur schließen kann. Zudem sieht man Signale für weitere 13 Protonen im olefinischen Bereich zwischen δ_{H} 5.87 bis 7.14, es kommt dabei bei sieben Protonen zur Überlagerung zu einem Multiplett. Ein weiteres Proton liegt unter dem CDCl_3 -Signal und kann erst aus dem ^1H - ^1H -COSY-Spektrum bestimmt werden. Die Signale bei δ_{H} 6.54, 6.61, 6.72 und 7.14 entsprechen jeweils einem Proton und erscheinen als Dublett eines Dubletts mit Kopplungskonstanten im Bereich von $^3J_{\text{HH}}$ 11 bzw. 15 Hz. Letztere ist typisch für olefinische Wasserstoffe in *trans*-Stellung. Ein weiteres Proton bei δ_{H} 6.17 mit der Kopplung $^3J_{\text{HH}}$ 8.0, 15.0 Hz korreliert sowohl mit der Aldehydgruppe, als auch mit dem olefinischen Wasserstoff bei δ_{H} 7.14. Das Signal bei δ_{H} 5.87 erscheint als Dublett und kennzeichnet das andere Ende der Polyenkette. Folgende Teilstrukturen lassen sich aus dem ^1H - und dem ^1H - ^1H -COSY-Spektrum ermitteln:

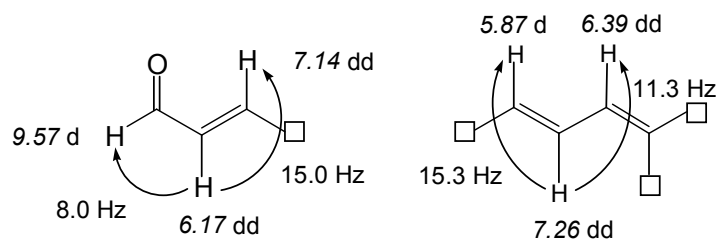
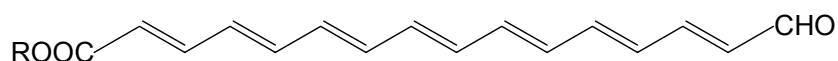


Abbildung 95: Teilstrukturen von **99**

Im DEPT-Spektrum erscheinen 16 Methineinheiten einer Polyenkette im Bereich von δ_{C} 123.1 bis 151.4, die beiden Carbonylsignale bei δ_{C} 193.4 und 173.3 sind einem Aldehydkohlenstoff und einer silylierten Carbonsäure zuzuordnen.

Aus den Informationen des HMQC- und des HMBC-Spektrum kann man die Struktur einer silylierten all-*trans*-16-Oxo-hexadeca-heptaensäure zusammensetzen.

Die *E*-Konformation der Doppelbindungen geht aus den Kopplungskonstanten der Protonen hervor. Auch das Fehlen des sogenannten „*cis*-Peaks“ im nahen UV-Bereich ist ein Hinweis auf die all-*trans*-Struktur von **cc9**.^[101] Aufgrund von Überlagerung können die Verschiebungen der Methinsignale im Mittelbereich der Kette nicht genauer bestimmt werden. Für den Farbstoff aus *Calostoma cinnabarinum* wird folgende Struktur vorgeschlagen:



99 R = Si(CH₃)₃

100 R = H

Abbildung 96: Strukturvorschlag für **99** und den Naturstoff **100**

3.9.6 Methylierung von cc9

Für die Methylierung wird ein Teil des Farbstoffes in etwas Methanol suspendiert und mit etherischer Diazomethanlösung bei 0° C methyliert. Dabei löst sich der orange Niederschlag vollständig mit leuchtend gelber Farbe. Nach Entfernen des Ethers und Verteilung zwischen Wasser und Chloroform erhält man eine zitronengelbe Substanz **101**, die sich gut in unpolaren Lösungsmitteln löst.

Im EI-Massenspektrum zeigt **101** einen gegenüber dem Naturstoff um 14 Masseneinheiten höheren Basispeak bei m/z 270, was einer Monomethylierung entspricht. Das bei 290 K aufgenommene Tieftemperatur-NMR-Spektrum ermöglicht die Zuordnung weiterer Methinprotonen.^d Die folgende Tabelle gibt eine Zusammenstellung der ¹H-NMR-Daten der methylierten Verbindung wieder.

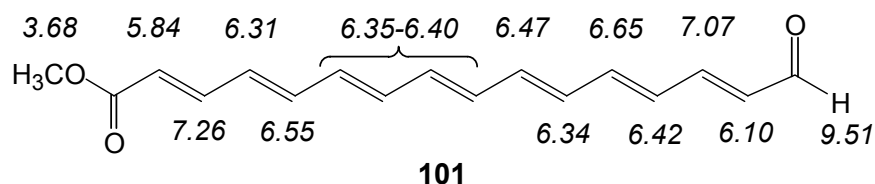


Abbildung 97: ¹H-NMR-Daten von **101**

^d Ich danke Herrn Dr. P. Spiteller für die Durchführung der Massen- und NMR-Experimente.

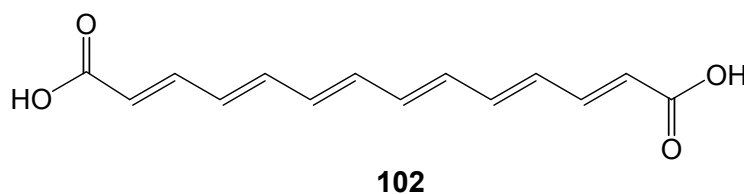
Tabelle 6: Zusammenfassung der ^1H -NMR-Daten von **101**

δ_{H} [ppm]	Art	Multiplizität	J_{HH} in Hz	$^nJ_{\text{HH}}$ -Kopplungen (COSY) δ_{H} [ppm]
3.68	CH_3	s		
5.84	CH	d	15.3	7.26
7.26	CH	dd	11.3, 15.3	5.84, 6.31
6.31	CH	dd	11.3, 14.6	7.26, 6.55
6.55	CH	dd	11.3, 14.6	6.31, 6.36*
6.35 - 6.40*	CH	m	*	6.65, 7.07, 6.35 - 6.40*
6.47	CH	dd	11.3, 15.0	6.34
6.34	CH	m	°	6.47, 6.65
6.65	CH	dd	11.3, 14.6	6.42, 6.34*
6.42	CH	dd	11.3, 15.0	7.07, 6.65*
7.07	CH	dd	11.3, 15.0	6.10, 6.42
6.10	CH	dd	8.0, 15.0	7.07, 9.51
9.51	COH	d	8.0	6.10

*: genauere Zuordnung wegen Überlagerung der Signale nicht möglich
 °: wegen der Überlagerung der Signale ist eine genauere Bestimmung der Kopplungskonstanten nicht möglich, die Lage des Signals ist aus dem COSY-Spektrum jedoch genau zu bestimmen

3.9.7 Bekannte Verbindungen ähnlicher Struktur

Polyketidfarbstoffe mit nicht-carotinoider Struktur wurden bereits mehrmals in höheren Pilzen nachgewiesen. Der erste Vertreter dieses Verbindungstyps ist das Corticrocin (**102**), eine 2,4,6,8,10,12-Tetradecaheptadecarbonsäure, das Erdtman aus dem Myzel des mykorrhizabildenden Pilz *Corticium croceum* (Bres.) (= *Piloderma fallax* (Lib.) Stalpers) isolieren konnte.^[102]

**Abbildung 98:** Corticrocin (**102**) aus *Corticium croceum*

Der Verbindung aus *Calostoma cinnabarinum* noch ähnlicher ist der von Mocek isolierte 2,4,6,8,10,12,14-Hexadecaheptaen-1,16-dialdehyd (**103**) aus Kulturen der Fingerhut-Verpel (*Verpa digitaliformis* (Pers.) Fr.), einem Vertreter der Ascomyceten.^[103]

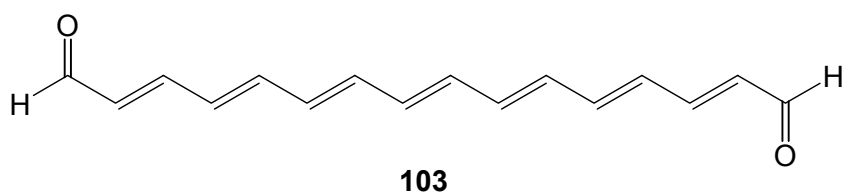
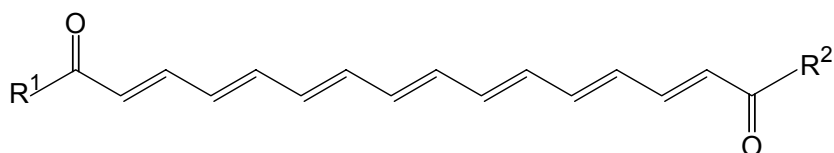


Abbildung 99: Verpacrocicinal (**103**) aus *Verpa digitaliformis*

Im Rahmen der Synthese eines Bakterienfarbstoffes aus *Xanthomonas juglandis* (Pierce) Dye synthetisierte Andrewes einen 16-Hexadeca-2,4,6,8,10,12,14-heptaen-carbonsäuremethylester-aldehyd, welcher identisch ist mit dem Methylester **101**.^[104] Der Vergleich der analytischen Daten bestätigt dies.

3.9.8 Chemotaxonomische Betrachtung

Von besonderer Bedeutung auf chemotaxonomischer Ebene sind die von Kahner isolierten Boletocrocine, die in den asiatischen Pilzen *Boletus laetissimus* Hongo und *Boletus rufo-aureus* Masee (= *Boletus flammeus* Heim) vorkommen.^[34]



Boletocrocicinal A (**65**): R¹ = L-Asp, R² = L-Ile

Abbildung 100: Boletocrocicinal A (**65**) aus *Boletus laetissimus*

Der Farbstoff **100** aus *Calostoma cinnabarinum* und das Hauptpigment von *Boletus laetissimus*, Boletocrocicinal A (**65**), besitzen die gleiche Polyeneinheit, die bei letzterem über eine Peptidbindung mit zwei L-Aminosäureresten verbunden ist. Pulvinsäuren, so wie in *Boletus laetissimus*, sind in *Calostoma cinnabarinum* nicht enthalten. Die bereits sequenzanalytisch bewiesene enge verwandtschaftliche Beziehung von *Calostoma cinnabarinum* zu den *Boletales* wird durch dieses Ergebnis bestätigt. Die gastroiden

Fruchtkörper werden als Weiterentwicklung der boletalen Form angesehen.^[74] DNA-Untersuchungen beweisen auch, daß diese Art nicht wie bisher angenommen, mit *Tulostoma* in naher Beziehung steht. Das Hauptverbreitungsgebiet der Gattung *Calostoma* ist der asiatische Raum. Bei einer Untersuchung der Artenvielfalt dort könnten sicher weitere Erkenntnisse gewonnen werden.^[74,98]

3.10 Vergleich der molekularbiologischen Daten mit den Ergebnissen der pigmentchemischen Untersuchung

3.10.1 Einordnung anhand sequenzanalytischer Untersuchungen

Neueste Untersuchungen bestätigen die Gliederung der *Boletales* in fünf Unterordnungen, die nun einundzwanzig Familien umfassen. Für einzelne Familien wurde eine andere Zuordnung vorgeschlagen, so daß sich die *Boletales* wie folgt darstellen.^[74,89,98,99]

- | | |
|--|--|
| I <i>Coniophorineae</i> Agerer & Ch. Hahn | <ul style="list-style-type: none">• <i>Coniophoraceae</i> Ulbr. (incl. <i>Tapinellaceae</i> Ch. Hahn und <i>Hygrophoropsidaceae</i> Kühner)• <i>Serpulaceae</i> Jarosch & Bresinsky |
| II <i>Paxillineae</i> Feltgen | <ul style="list-style-type: none">• <i>Gyrodontaceae</i> (Singer) Heinm.• <i>Melanogastraceae</i> Tul.• <i>Paxillaceae</i> R. Maire |
| III <i>Suillineae</i> Besl & Bresinsky | <ul style="list-style-type: none">• <i>Gomphidiaceae</i> R. Maire: Singer• <i>Rhizopogonaceae</i> Dodge• <i>Suillaceae</i> (Singer) Besl & Bresinsky• <i>Truncocolumellaceae</i> Agerer |
| IV <i>Sclerodermatineae</i> Binder & Bres. | <ul style="list-style-type: none">• <i>Boletinellaceae</i> Binder & Bresinsky• <i>Pisolithaceae</i> Ulbr.• <i>Astraeaceae</i> Zeller ex Jülich• <i>Calostomataceae</i> E. Fischer• <i>Gyroporaceae</i> (Singer) Besl & Bresinsky• <i>Sclerodermataceae</i> E. Fischer |
| V <i>Boletineae</i> Rea emend. Gilbert | <ul style="list-style-type: none">• <i>Strobilomycetaceae</i> Gilbert• <i>Boletaceae</i> Chev.• <i>Chamonixiaceae</i> Jülich• <i>Octavianinaceae</i> Loquin ex Pegler & Young |

Bevorzugt wird oft die schematische Darstellung der molekularbiologischen Ähnlichkeit als Cladogramm. Auch die Beziehungen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Pilze können so dargestellt werden. Zusätzlich werden ausgewählte Arten mit charakteristischen Inhaltsstoffen oder bisher strittiger Einordnung in dieses Schema mitaufgenommen. Grundlage dieses Diagramms sind die Ergebnisse der sequenzanalytischen Untersuchungen von Binder, Bresinsky und Jarosch.^[74,89,98,99] Dabei wurden hochkonservative rDNA-Sequenzen amplifiziert und mittels Gelelektrophorese sequenziert. Die Auswertung erfolgte durch geeignete phylogenetische Programme.

In diesem Schema stellen die Längen der Balken keine absoluten Werte dar, es soll nur die relative Beziehung der Arten zueinander veranschaulicht werden.

Angegeben sind jeweils die Familien- und Gattungsnamen. Arten, die sequenzanalytisch keiner Gattung zugeordnet werden konnten, sind gekennzeichnet („o. Zuordnung“). Die Pilzarten, die Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren, sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Da keine Arten der *Suillineae* und *Coniophorineae* in dieser Arbeit behandelt wurden sind diese aus dem Schema ausgenommen. *Clavulinopsis fusiformis* und *Pycnoporellus fulgens* zählen nicht zur Ordnung der *Boletales* und werden deshalb in dieser Aufstellung nicht berücksichtigt.

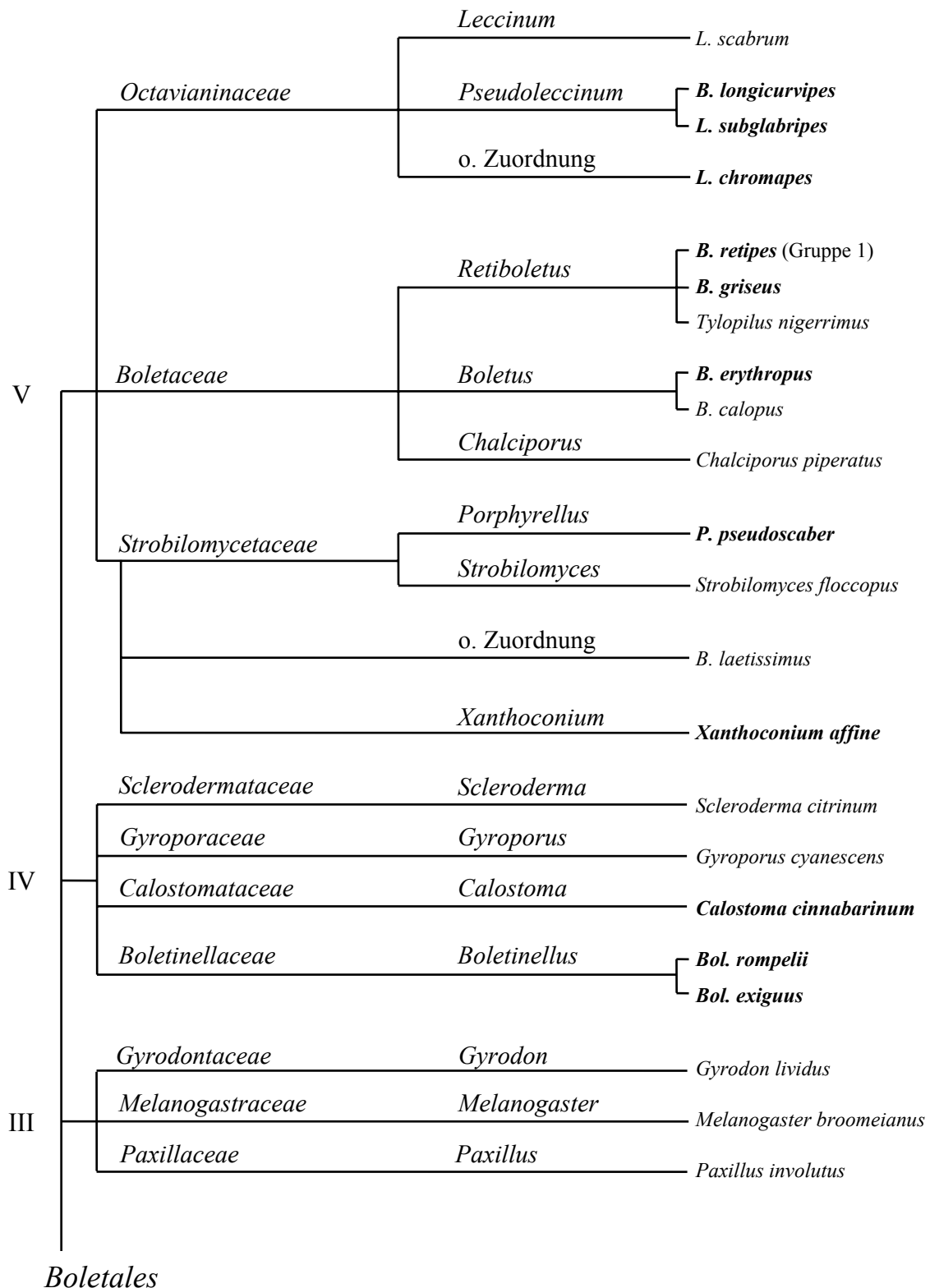


Abbildung 101: Verwandtschaftliche Stellung ausgewählter Arten der *Boletales*, basierend auf sequenzanalytischen Ergebnissen

3.10.2 Einordnung anhand gemeinsamer Sekundärmetabolite

Eine Gliederung der Pilze, die sich am Vorkommen charakteristischer Sekundärmetabolite orientiert, zeigt ein stark abweichendes Bild. Die Biosynthese gleicher Inhaltsstoffe kann ebenso Hinweis auf verwandtschaftliche Beziehungen geben, da dieser die gleichen Enzyme und somit gleiche genetische Informationen zugrunde liegen. (**Abb. 102**)

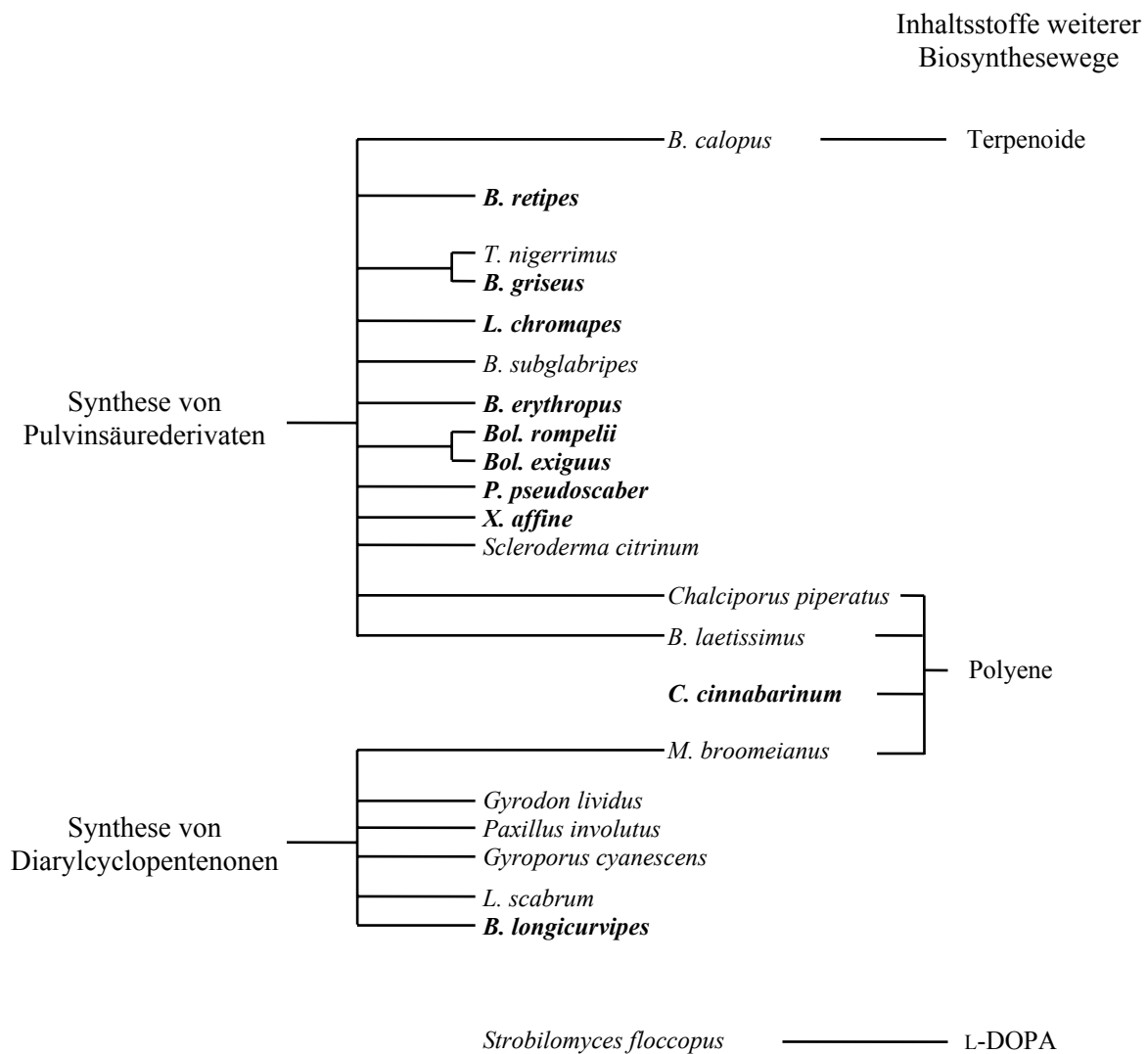


Abbildung 102: Einordnung ausgewählter Arten anhand gemeinsamer Sekundärmetabolite

Als Einordnungskriterien zählen die Synthese von Pulvinsäurederivaten und Diarylcyclopentenonen, die sich von der gemeinsamen Ausgangsverbindung Atromentin ableiten. Innerhalb der großen Gruppe der Pulvinsäuren wird unterschieden in einfache Pulvinsäuren, methylierte und dimere Pulvinsäurederivate. Für die weitere Einteilung wird das Vorkommen von Retipoliden, Polyenen, gebildet durch die Polyketidsynthese, und Calopinen, als Produkte des Isoprenoidwegs, berücksichtigt. Da keine Vertreter der *Suillineae* und *Coniophorineae* untersucht wurden, werden die Verbindungsklassen der Grevilline, Terphenylchinone und prenylierten 1,4-Benzochinone nicht in dieses Schema miteinbezogen.

- Da die Retipolide ihren Ursprung ebenfalls im Shikimisäureweg haben, steht *Boletus retipes* in dieser Aufstellung näher bei der Gruppe der pulvinsäureproduzierenden Arten als *Boletus calopus*, der mit der Bildung von Calopinen einen weiteren Stoffwechselweg beschreitet. Durch den Nachweis von Xerocomsäure (15) schließt sich *B. retipes* der Gattung *Boletus* an.
- Besonders hervorzuheben ist die Stellung von *Boletus griseus* und *Tylopilus nigerrimus*, die vom pigmentchemischen Gesichtspunkt nicht zur Gattung *Retiboletus* gestellt werden können, da sie zum einen keine Retipolide enthalten und zum anderen sich durch die Bildung methylierter Pulvinsäurederivate von *B. retipes* klar abgrenzen. Bestätigt wird jedoch die bereits sequenzanalytisch nachgewiesene nahe Beziehung beider Arten zueinander.
- Der Pilz *Leccinum chromapes* bildet neben Isoxerocomsäure-methylester (74) auch einfache Pulvinsäurederivate und wird daher zwischen *T. nigerrimus* und *B. subglabripes* platziert, welcher nur unmethylierte Pulvinsäuren enthält. Die bisher als *Leccinum* geführte Art sollte aufgrund der pigmentchemischen Befunde künftig *Boletus* zugerechnet werden und damit *Boletus chromapes* genannt werden.
- Die beiden Vertreter der Gattung *Boletinellus* werden ebenfalls in die große Gruppe der Pulvinsäuren produzierenden Arten eingegliedert. Die auf molekularbiologischen Grundlagen beruhende Abtrennung der Familie der *Boletinellaceae* von den *Gyrodontaceae* kann auch unter chemotaxonomischen Gesichtspunkten als gesichert angesehen werden.
- Orientiert man sich an der Bildung gleicher Sekundärmetabolite, so rücken *Porphyrellus pseudoscaber* und *Xanthoconium affine* aus pigmentchemischer Sicht nahe zu Vertretern der Gattung *Boletus*. Beide Arten gliedern sich durch die Bildung von Farbstoffen der Badion-Klasse gut in diese Gruppe ein. Entgegen der sequenzanalytischen Erkenntnisse unterscheiden sie sich andererseits deutlich von *Strobilomyces*, dessen Sekundärstoffwechsel auf der Stufe von einfachen aromatischen Verbindungen endet. Die Bildung von L-DOPA

wird als Hinweis auf einen wenig differenzierten, ursprünglichen Sekundärmetabolismus gedeutet, weshalb die Gattung näher bei der ebenfalls als ursprünglicher beurteilten *Paxillaceae* positioniert wird.

- Auch *Scleroderma citrinum* und *Chalciporus piperatus* enthalten dimere Pulvinsäurederivate. Der Nachweis von Sclerocitrin (**34**) in beiden Arten begründet ihre nahe Stellung zueinander. *Chalciporus piperatus* produziert zudem Chalciporon und bildet den Übergang zu Arten, die außer dem Shikimisäureweg auch den Polyketidsyntheseweg beschreiten.
- Obwohl *Calostoma cinnabarinum* außer dem all-*trans*-Hexadecaheptaencarbonsäurealdehyd **100** keine weiteren Farbstoffe enthält, sollte die strukturelle Ähnlichkeit des Pigmentes mit Boletocrocin A (**65**) nicht unberücksichtigt bleiben, zumal die nahe Beziehung zu den *Boletales* auch sequenzanalytisch bestätigt werden konnte. Daher wird der Pilz in der Mitte der polyenhaltigen Arten angesiedelt, zwischen *Boletus laetissimus* und *Melanogaster broomeianus*, also zwischen den Gruppen der Pulvinsäure- und der Diarylcyclopentenon-Produzenten.
- *Melanogaster broomeianus* stellt das Verbindungsglied zu *Paxillus involutus* und *Gyrodon lividus* dar, die sich durch die Bildung von (–)-Involutin (**36**) und (–)-Chamonixin (**37**) von *Gyroporus cyanescens* und *Leccinum scabrum* unterscheiden. Letztere enthalten die höher oxidierten Cyclopentenone Gyrocyanin (**35**) und Gyroporin (**39**).
- In dieser Gruppierung wird auch die Art *Boletus longicurvipes* eingeordnet, die sich durch die Bildung von Gyroporin (**39**) pigmentchemisch zur Gattung *Leccinum* mit seinem typischen Vertreter *Leccinum scabrum* eingliedert. Unter pigmentchemischem Aspekt sollte die Art daher künftig als *Leccinum longicurvipes* bezeichnet werden.

Dieser Klassifizierungsansatz, allein auf chemotaxonomischen Merkmalen beruhend, soll die bisherigen, morphologisch, mikroskopisch und molekularbiologisch begründeten Systeme nicht außer Kraft setzen. Jedoch sollte in einigen widersprüchlichen Fällen die bisherige taxonomische Beurteilung überprüft werden.

3.11 *Clavulinopsis fusiformis* (Fr.) Corner

3.11.1 Der Pilz

Die Spindelförmige Keule (*Clavulinopsis fusiformis* (Fr.) Corner) gehört zur Familie der *Clavariaceae* innerhalb der Ordnung der *Cantharellales*.

Der Pilz ist dottergelb oder kanariengelb gefärbt und wächst von August bis November bevorzugt auf grasigen Stellen, Heiden oder Magerwiesen. Die spindelförmigen, leicht abgeplatteten Fruchtkörper werden 6 bis 14 cm hoch, bis zu 6 mm breit und stehen dicht gedrängt in Büscheln. Die Pilze bilden einfache, selten geteilte Keulen, deren Spitzen sich im Alter bräunlich verfärben. Die anfangs festen Fruchtkörper werden bald hohl und brüchig. Der Geruch ist unauffällig, der Geschmack bitter.

Die Art tritt sowohl in Nordamerika als auch in Mitteleuropa auf, wo sie jedoch durch intensive Bewirtschaftung der Flächen selten geworden ist.^[66,105]



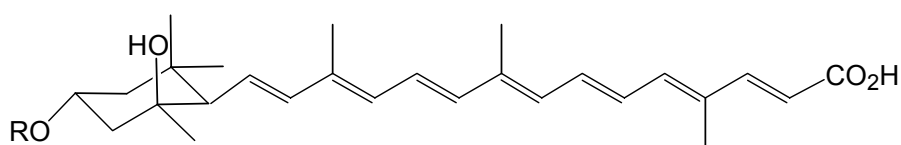
Abbildung 103: Spindelförmige Keule (*Clavulinopsis fusiformis* (Fr.) Corner)^[12]

3.11.2 Bisherige Erkenntnisse und Aufgabe dieser Arbeit

Besl konnte anhand dünnschichtchromatographischer Untersuchungen mehrere gelb-orange Farbstoffe in Fruchtkörpern von *Clavulinopsis fusiformis* detektieren.^[106] Die Reaktion dieser Verbindungen mit konzentrierter Schwefelsäure ließ dabei auf eine carotinoidähnliche Struktur schließen. Diese Vermutung wurde durch Knops bestätigt.^[107] Der Vergleich mit den carotinoiden Farbstoffen der Gattungen *Clavulinopsis*, *Craterellus* und *Cantharellus* zeigte keine Übereinstimmungen.^[108]

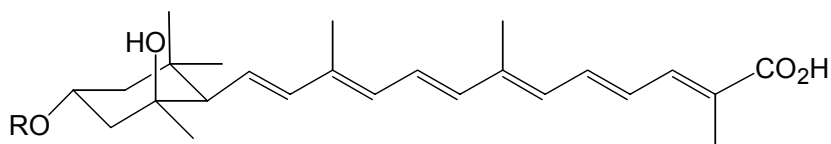
Schließlich gelang es Dorn, aus der amerikanischen Spezies die Apocarotinoide Fusiformin A (**102**) und B (**103**), deren Schwefelsäureester **104** und **105** und sowie die *E/Z*-Isomere **106**, **107** und **108** dieser Verbindungen zu isolieren und deren Struktur aufzuklären.^[109]

Im Rahmen dieser Arbeit soll nun die deutsche Spezies untersucht und deren Inhaltsstoffe mit denen amerikanischer Exemplare verglichen werden.



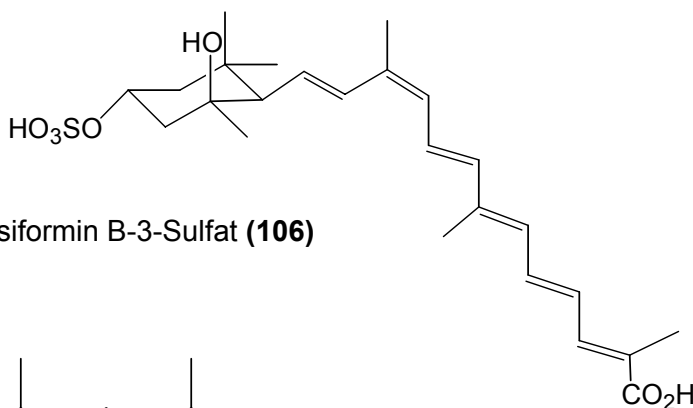
Fusiformin A (**102**): R = H

Fusiformin A-3-sulfat (**104**): R = SO₃H

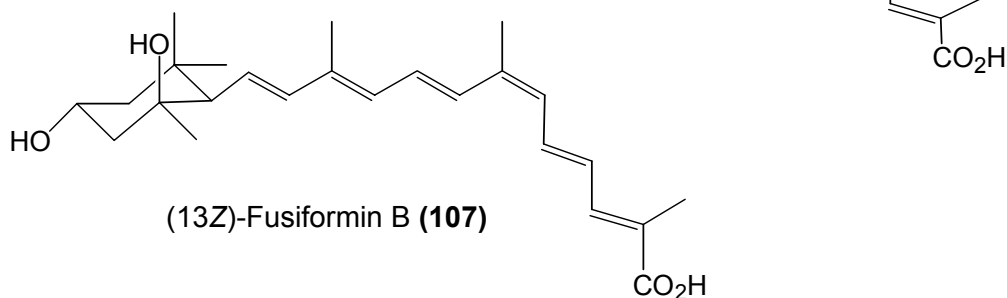


Fusiformin B (**103**): R = H

Fusiformin B-3-sulfat (**105**): R = SO₃H



(9Z)-Fusiformin B-3-Sulfat (**106**)



(13Z)-Fusiformin B (**107**)

Abbildung 104: Farbstoffe aus *Clavulinopsis fusiformis*

3.11.3 Isolierung der Farbstoffe

Aufgrund der Licht- und Oxidationsempfindlichkeit der Pigmente wird die gesamte Aufarbeitung unter Schutzgasatmosphäre und unter Lichtausschluß vorgenommen.

Die tiefgekühlten Pilze werden grob zerkleinert, mit Petrolether entfettet und anschließend mit Essigsäureethylester erschöpfend extrahiert. Der erhaltene gelbe Extrakt wird bei Raumtemperatur eingeengt und mehrmals mit Wasser gewaschen. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird der bräunlichgelbe Rückstand in Methanol aufgenommen, über Kartusche filtriert und mittels analytischer HPLC an RP 18 mit dem ethanolischen Extrakt amerikanischer Exemplare verglichen. Zudem werden die Farbstoffe der deutschen Spezies durch Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie getrennt und, soweit möglich, durch ^1H -NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie, mindestens jedoch durch Koinjektion identifiziert.

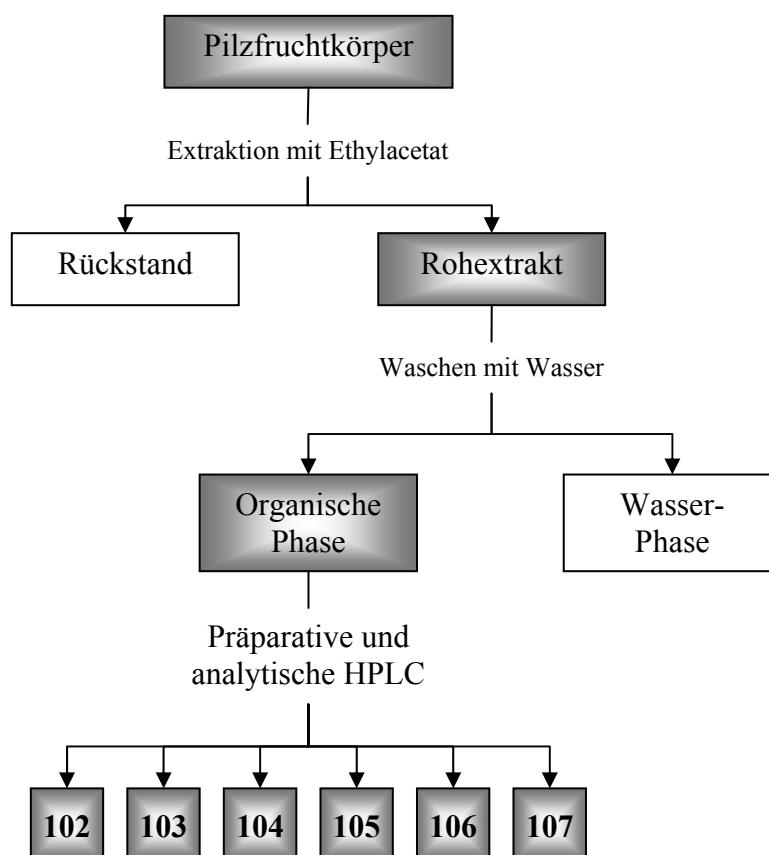


Abbildung 105: Isolierung der Fusiformine 102-107 aus *Clavulinopsis fusiformis*

3.11.4 Ergebnisse

Die analytischen HPL-Chromatogramme der Rohextrakte zeigen, daß sowohl die amerikanische als auch die europäische (deutsche) Spezies von *Clavulinopsis fusiformis* eine Vielzahl von Farbstoffen mit carotinoiden Strukturen enthalten. Dabei ermöglichen die Absorptionsspektren der Chromatogramme bereits die Zuordnung der Pigmente zur Fusiformin A- bzw. Fusiformin B-Gruppe. Das um eine Doppelbindung kürzere Chromophor des Fusiformin B-Grundkörpers bewirkt eine hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums um 26 nm.

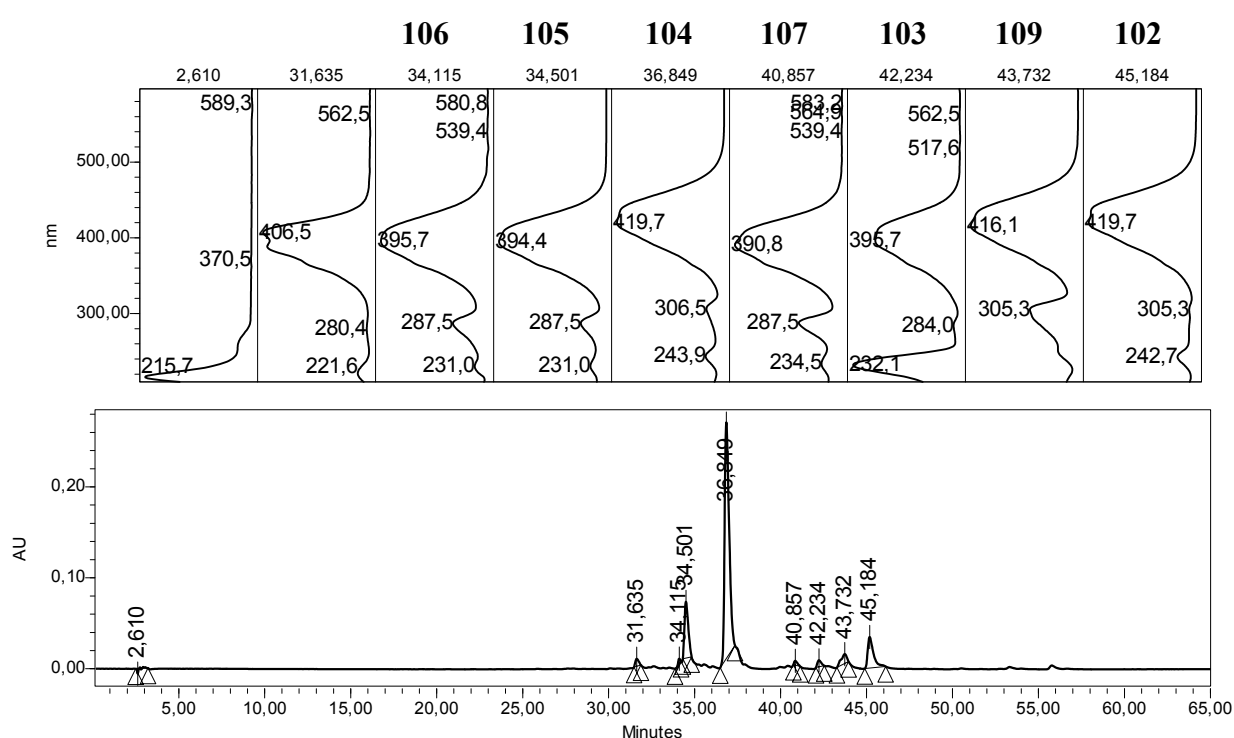


Abbildung 106: Rohextrakt von *Clavulinopsis fusiformis* (Fundort Deutschland)

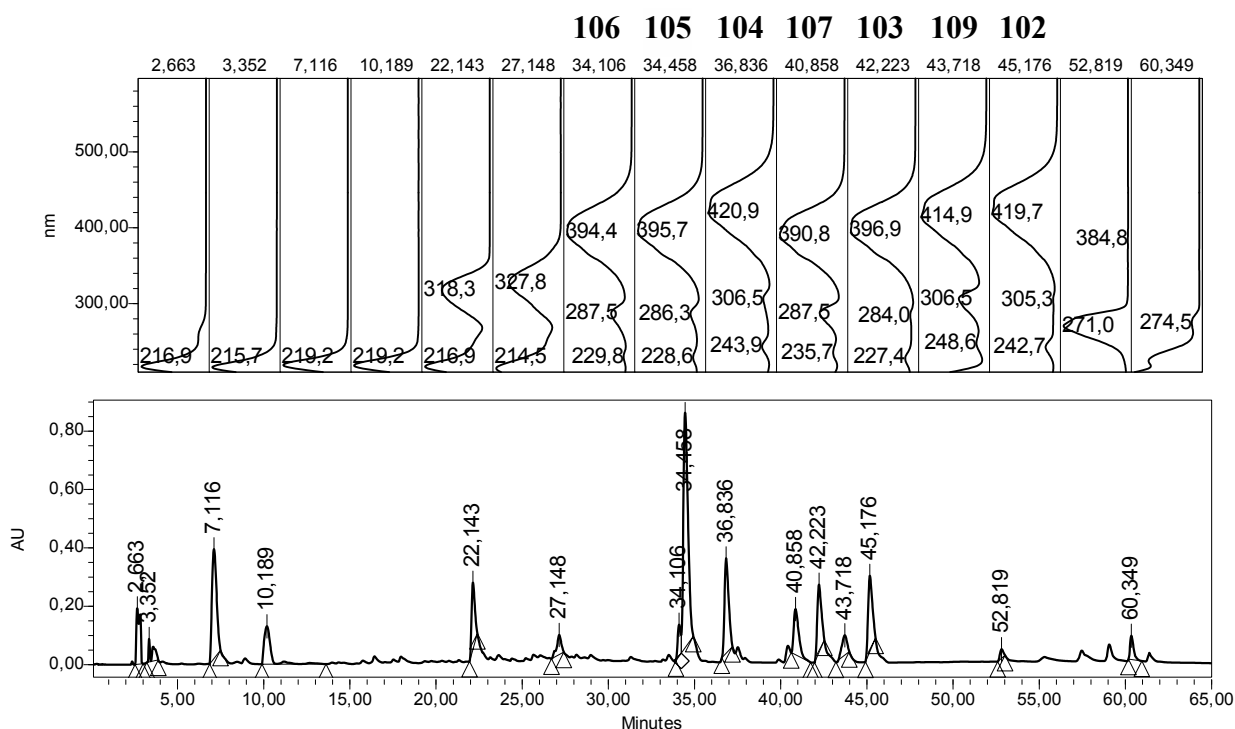


Abbildung 107: Rohextrakt von *Clavulinopsis fusiformis* (Fundort USA)

Wie sich in folgender Untersuchung herausstellt, sind in beiden Exemplaren die gleichen Farbstoffe zu finden, jedoch zu verschiedenen Anteilen. Während die amerikanischen Exemplare vor allem Fusiformin A (**102**), Fusiformin B (**103**) und dessen Schwefelsäureester **104** und **105** in etwa gleichen Anteilen enthalten^[109], ist in dieser Kollektion aus Deutschland Fusiformin A-3-sulfat (**104**) das Hauptpigment, gefolgt von Fusiformin B-3-sulfat (**105**) und Fusiformin A (**102**). Die beiden Farbstoffe Fusiformin B (**103**) und (13Z)-Fusiformin B (**107**) können aufgrund ihrer Strukturähnlichkeit selbst durch analytische HPLC nicht ausreichend getrennt werden, um aussagekräftige Spektren zu erhalten. Ein Vergleich der HPL-Chromatogramme zeigt jedoch übereinstimmende UV/VIS-Absorptionsspektren und Retentionszeiten, weshalb von identischen Substanzen ausgegangen wird. Das von Dorn beschriebenen (Z)-Fusiformin A-sulfat (**108**) kann aufgrund der geringen Pilzmenge weder in den deutschen, noch in den amerikanischen Exemplaren detektiert werden. Vielmehr tritt in beiden Kollektionen ein Farbstoff **109** mit der Retentionszeit R_t 43.72 min und einem dem Fusiformin A (**102**) sehr ähnlichen Absorptionsspektrum auf. Vermutlich handelt es sich hier um ein (Z)-Isomer von **102**. Darauf deutet auch die erhöhte Absorption bei λ 307 nm (*cis*-Peak) hin. Eine Isolierung und genaue Charakterisierung ist aufgrund der Ähnlichkeit mit **102** nicht möglich. Möglicherweise kam es bei den Pilzen durch Lichteinwirkung bei der Lagerung zur Bildung von *cis/trans*-Isomeren.

3.12 *Pycnoporellus fulgens* (Fr.) Donk

3.12.1 Pilzbeschreibung



Abbildung 108: *Pycnoporellus fulgens*^[110]

Der Leuchtende Orangeporling (*Pycnoporellus fulgens* (Fr.) Donk) (= *Polyporus fibrillosus* P. Karst) gehört zur Familie der Porlinge. Er besitzt einjährige, fächerförmig ausgebreitete Fruchtkörper, die zwischen 2 und 10 cm breit und bis zu 2.5 cm dick werden können. Das anfangs weiche, wässrige, orangerote Fleisch wird schließlich faserig und zäh und dunkelt zu rostrot nach. Auffällig ist auch die Veränderung der Poren, die sich mit zunehmendem Alter des Pilzes erst vergrößern und schließlich aufspalten, was dazu führte, daß der Pilz früher zur Gattung der Stachelpilze (*Hydnum*) gezählt wurde. Zu finden ist der Leuchtende Orangeporling von Frühjahr bis Herbst vor allem auf totem Nadelholz, aber auch auf Espen, Erlen oder Birken, oftmals auch auf Bäumen, die vorher durch den Befall von Rotrandigen Baumschwammes (*Fomitopsis pinicola* (Swartz: Fr.) Karst.) abgetötet wurden.^[111]

3.12.2 Bisherige Erkenntnisse

Über die Inhaltsstoffe von *Pycnoporellus fulgens* sind bisher keine Arbeiten bekannt.

3.12.3 Isolierung der Inhaltsstoffe

Vom gefrorenen Pilz werden einige Stücke abgebrochen und mit einer Mischung aus Aceton/Methanol im Verhältnis 1:1 bis zur Farblosigkeit der Lösung extrahiert. Der kräftig orangefarbene Rohextrakt wird bei 40° C im Vakuum eingengt und dünnschichtchromatographisch untersucht. Dabei zeigt sich, daß eine Isolierung des orangen Farbstoffes durch Chromatographie an Kieselgel- oder Reversed Phase-Systemen nicht möglich ist, da entweder starkes Tailing oder irreversible Bindung an die stationäre Phase eine Trennung verhindern. Auch Gelchromatographie an Sephadex[®] LH 20 und LH 60 führt zu keiner Anreicherung des Farbstoffes. Durch Extraktion mit Petrolether und Ethylacetat im Basischen und im Sauren werden ein Teil der Verunreinigungen wie Zucker und Fettsäuren entfernt. Bei Zugabe von verdünnter Salzsäure hellt sich die rostrote Farbe der wässrigen Phase nach blassgelb auf und geht dann vollständig in die Ethylacetatphase über. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum verbleibt ein braunroter Rückstand. Dieser löst sich teilweise in Ethylacetat und Aceton, geht jedoch nur in Methanol oder DMSO vollständig in Lösung.

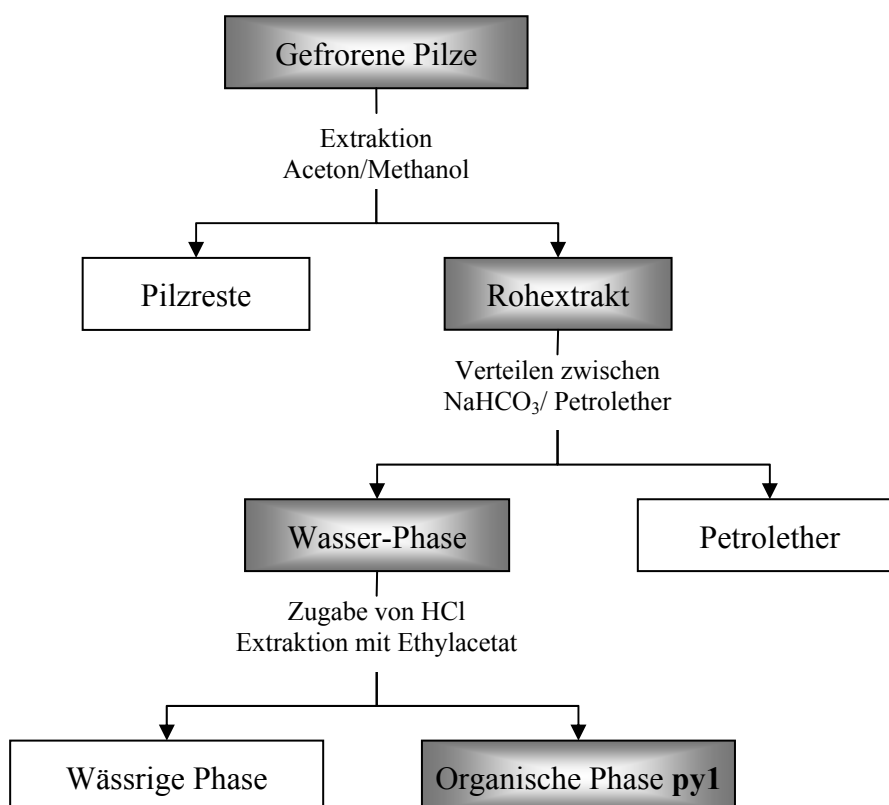


Abbildung 109: Gewinnung des Extraktes aus *Pycnoporellus fulgens*

3.12.4 Strukturaufklärung

Das UV/VIS-Absorptionsspektrum der Rohverbindung zeigt neben zwei Schultern bei 287 und 316 nm ein relatives Maximum bei 431 nm, das auch die Ursache der orangen Farbe ist. Dieses relative Maximum wird bei Erhöhung des pH-Wertes zu 524 nm bathochrom verschoben. Bei niedrigen pH-Werten wird dieses Maximum abgeschwächt, so daß nur noch ein Absorptionsmaximum bei 237 nm und eine Schulter bei 282 nm zu sehen ist.

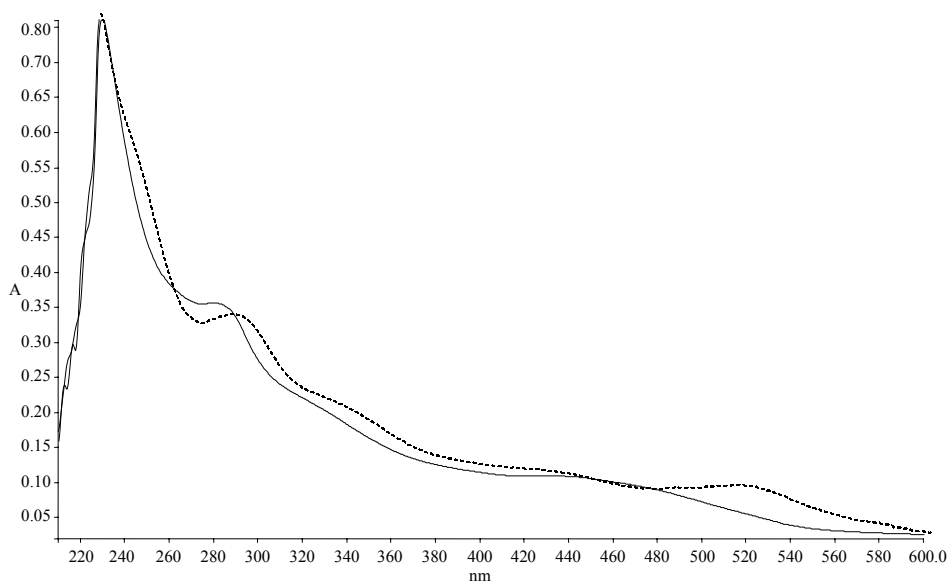


Abbildung 110: UV/VIS-Spektrum des Extraktes von *Pycnoporellus fulgens*
bei pH 7 (—) und pH 14 (---)

Das IR-Spektrum zeigt neben der breiten, intensiven Bande der OH-Valenzschwingungen bei 3436 cm^{-1} zwei schmale Absorptionsbanden bei 2922 und 2852 cm^{-1} , die charakteristisch für Valenzschwingungen von Methylengruppen sind. Zudem erscheinen die Valenzschwingungen gesättigter Carbonsäuren als verbreiterte Bande bei 1718 cm^{-1} und die der CO-Einfachbindungen bei 1194 cm^{-1} .

Im EI-Massenspektrum kann von **py1** kein aussagekräftiger Molekülpeak erhalten werden, erst das ESI-Spektrum (negativ Modus) zeigt einen Molekülpeak bei $m/z\ 415\ [\text{M-H}]^-$, woraus sich für **py1** die Summenformel $\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{O}_7$ ergibt.

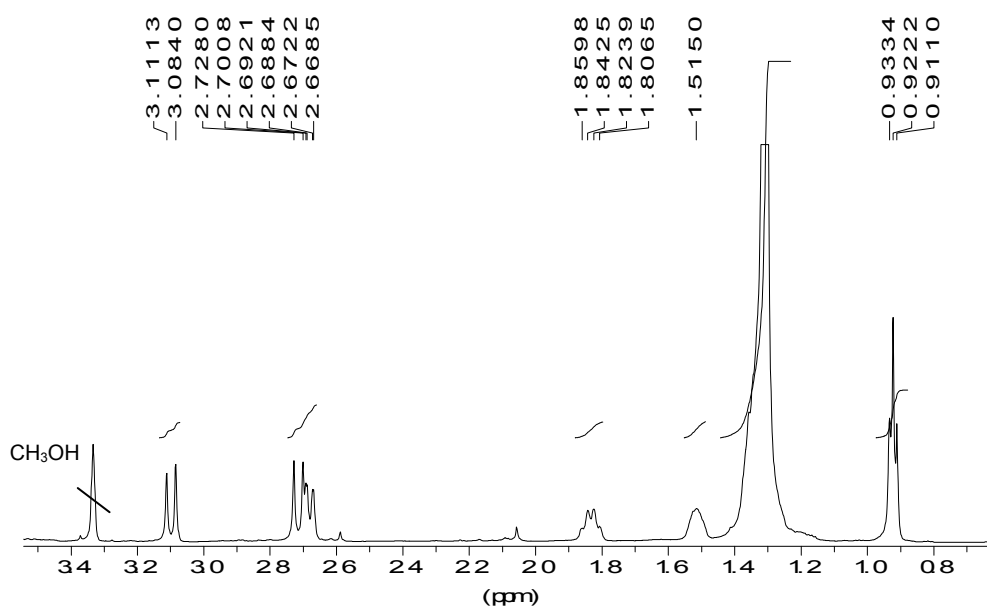


Abbildung 111: ^1H -NMR-Spektrum von **py1** (600 MHz, $[\text{D}_4]$ Methanol)

Das ^1H -NMR-Spektrum zeigt nur Signale im Bereich von δ_{H} 0.92 bis 3.10, aromatische Protonen fehlen hier. Neben dem Triplet einer Methylgruppe bei δ_{H} 0.92 fällt ein sehr großes Singulett bei δ_{H} 1.31 auf, das ca. 27 Protonen entspricht. Die Struktur dieses großen Kohlenwasserstoffrestes kann mit Hilfe des DEPT-Spektrums als unverzweigte, gesättigte Kette bestimmt werden. Die übrigen Signale entsprechen jeweils einem Proton, wovon eines als Multiplett bei δ_{H} 1.52 und eines als Dublett eines Dubletts bei δ_{H} 1.83 erscheint. Das Dublett bei δ_{H} 2.71 koppelt mit dem Signal bei δ_{H} 3.10.

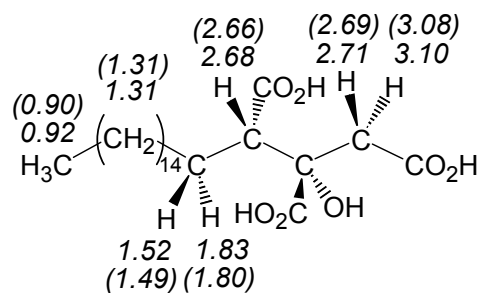
Dem HMQC-Spektrum ist zu entnehmen, daß die beiden Signale zu einer diastereotopen Methyleninheit gehören, ebenso wie die beiden Signale bei δ_{H} 1.52 und 1.83. Letztere korrelieren im HMBC-Experiment mit der Kohlenwasserstoffkette und bilden so die Verbindung zum restlichen Molekül. Dem ^{13}C -Spektrum ist zu entnehmen, daß außer den Signalen bei δ_{C} 14.7, 24.0, 28.4, 29.1 und einer Gruppe von sich überlagernden Signalen im Bereich von δ_{C} 30.7 bis 31.1 noch Kohlenstoffe bei tieferem Feld bei δ_{C} 42.7, 55.1 und 77.1 vorliegen. Die Verbindung enthält zudem drei Carboxylgruppen, die bei δ_{C} 174.2, 176.5 und 177.0 erscheinen.

Anhand der Korrelationen des HMBC-Spektrums können die Carbonsäuregruppen einer 2-Hydroxy-1,2,3-tricarbonsäure-Einheit zugeordnet werden. Mit Hilfe der Summenformel aus der massenspektrometrischen Untersuchung kann die Kettenlänge auf 16 Kohlenstoffatome bestimmt werden.

Bei der aus *Pycnoporellus fulgens* isolierten Hauptverbindung **py1** handelt es sich also um die 2-Hydroxy-nonadecan-1,2,3-tricarbonsäure **103**, die erstmals aus dem Lärchenschwamm (*Polyporus officinalis* Vill ex Fries) (= white Agaric) isoliert werden konnte und nach diesem Agaricin benannt wurde.^[112]

Der Vergleich mit Literaturwerten und Spektren von authentischem (2*S*,3*S*)-Agaricin zeigt, daß es sich bei **py1** um das gleiche Stereoisomer handelt.^[113] Eine genaue Bestimmung des Drehwertes ist aufgrund der farbigen Begleitsubstanz im Extrakt nicht möglich, da diese die Lichtdurchlässigkeit der Probe zu stark herabsetzt und eine exakte Einwaage nicht möglich ist.

Im Folgenden sind die Verschiebungen δ_{H} [ppm] der Protonen von **py1** und von synthetischem (2*S*,3*S*)-Agaricin zusammengestellt.



110

Abbildung 112: Vergleich der ^1H -NMR-Daten von **py1** aus *Pycnoporellus fulgens* und synthetischem **110** (Werte in Klammern)

3.12.5 Silylierung von **110**

Zur Bestätigung des Strukturvorschlages werden wenige Milligramm des Extraktes mit etwas MSTFA versetzt und zwei Stunden auf 40° C erhitzt. Anschließend wird die Probe massenspektrometrisch untersucht.^e Das Silylierungsprodukt **111** zeigt keinen Molekülpeak, das massenhöchste Fragment bei m/z 689 $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ mit der Zusammensetzung $\text{C}_{33}\text{H}_{69}\text{O}_7\text{Si}_4$ entsteht durch Verlust von 15 nach Abspaltung einer Methylgruppe. Der Basispeak bei m/z 469 hat eine Zusammensetzung von $\text{C}_{26}\text{H}_{53}\text{O}_3\text{Si}_2$ und entspricht **111** nach Abspaltung von zwei CO_2TMS Gruppen und Deprotonierung.

^e Ich danke Herrn Dr. P. Spiteller für die Messung.

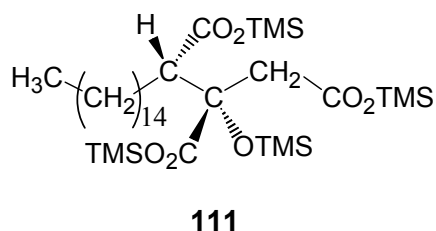


Abbildung 113: Silylierungsprodukt 111

3.12.6 Weitere Überlegungen

Da die Hauptkomponente keinerlei chromophore Gruppen trägt, wird die intensive Farbe des Rückstandes von Verbindungen verursacht, die in so geringen Mengen enthalten sind, daß sie, abgesehen von UV/VIS-Messungen, nicht miterfasst werden.

Eine Anreicherung der farbigen Bestandteile ist nicht möglich, da selbst Derivatisierungen (Acetylierung oder Methylierung) keine Unterschiede im Lösungs- und Laufverhalten der Substanzen hervorrufen.

Die Betrachtung der Struktur von Agaricin (**110**) zeigt, daß diese Eigenschaft durch Kombination von polaren und unpolaren Strukturelementen zustande kommt. Aufgrund dieser Eigenschaften werden auch heute noch Agaricin (**110**) und ähnliche Verbindungen als Wirkstoffe eingesetzt, da sie aufgrund der amphoteren Struktur gute Membrandurchgängigkeit besitzen. Zahlreiche Patente auf dem Gebiet der Pharmazie und Kosmetik bestätigen dies.

Die medizinische Wirkung des Inhaltsstoffes von *Fomes officinalis* ist schon seit P. Dioscorides (um 50 n. Chr.) bekannt. ^[1,114] Lange Zeit wurde **110** als Medikament zur Verringerung der nächtlichen Schweißabsonderung Tuberkulosekranker eingesetzt. ^[115] Die genaue Wirkung wurde inzwischen im Tierversuch erforscht. Neben einer anhydrotischen (schweißverringern) und parasympatholytischen (aktivitätsverringern) Wirkung greift **110** durch kompetitive Hemmung der Citrataufnahme auch in zahlreiche andere Stoffwechselvorgänge ein. ^[116,117]

Die Isolierung und Strukturaufklärung von Agaricin versuchte man anfangs des 19. Jahrhunderts, sie gelang jedoch erst im Jahre 1907 durch Thoms und Vogelsang. ^[112]

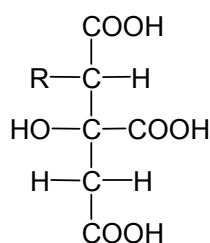


Abbildung 114: Darstellung des Lärchenschwammes von P. Matthioli (1560)^[118]

3.12.7 Verbindungen mit ähnlicher Struktur

Ähnliche Citronensäurederivate wurden bereits auch in anderen Pilzen nachgewiesen. Die aus *Cantharellus floccosus* Schw. isolierte Norcaperatsäure (**112**) besitzt eine um eine Acetateinheit kürzere Seitenkette und ist wahrscheinlich Mitverursacher der gastrointestinalen Störungen, die manchmal nach Verzehr dieser Pilze beobachtet werden können.^[119]

Die Decylcitronensäure (**113**) ist ein Sekundärmetabolit des Schimmelpilzes *Penicillium spiculisporum* Lehmann, welche dieser als Racemat durch Kondensation von Laurylsäure mit α -Oxalacetat synthetisiert.^[120]



Norcaperatsäure (**112**): $\text{R} = \text{C}_{14}\text{H}_{29}$

(-)-Decylcitronensäure (**113**): $\text{R} = \text{C}_{10}\text{H}_{21}$

Abbildung 115: Norcaperatsäure (**112**) aus *Cantharellus floccosus* und
(-)-Decylcitronensäure (**113**) aus *Penicillium spiculisporum*

4 Experimenteller Teil

4.1 Geräte und Materialien

4.1.1 Physikalische Daten

Schmelzpunkte

Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte auf einem Thermovar Mikroheiztisch der Firma Reichert. Die angegebenen Werte sind unkorrigiert.

UV/VIS-Spektren

Die UV/VIS-Spektren wurden mit einem Hewlett-Packard 8452 A-Adiode Spectrophotometer bei 20° C in einer Standard-Quarzküvette ($l = 1\text{ cm}$) aufgenommen.

Das Lösungsmittel und gegebenenfalls ein von pH 7 abweichender pH-Wert sind angegeben, Schultern werden mit sh gekennzeichnet.

Bei qualitativen Messungen werden die Wellenlängen der relativen Absorptionsmaxima λ_{max} in nm angegeben. Bei quantitativen Messungen werden außer den Absorptionsmaxima λ_{max} in nm auch die jeweiligen dekadischen Logarithmen der molaren Extinktionskoeffizienten $\log \epsilon$ angegeben.

IR-Spektren

Die Messungen der IR-Spektren wurden an einem Bruker FT-IR Spektrometer IFS 45 durchgeführt. Die Substanzen wurden als KBr-Presslinge gemessen. Angegeben werden die Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ in cm^{-1} der Banden und ihre Intensitäten durch ss (sehr stark), s (stark), m (mittel) und w (schwach). Breite Signale werden mit br (breit) gekennzeichnet.

CD-Spektren

Die Messung der CD-Spektren erfolgten an einem Instruments S. A. Jobin Yvon CD-6-Dichrograph. Das verwendete Lösungsmittel, die Wellenlängen der Maxima, Minima und Nulldurchgänge sind angegeben, ebenso die differentielle Absorbanz $\Delta\epsilon$.

Optische Drehwerte

Die Drehwerte wurden an einem Perkin-Elmer 241 Polarimeter bestimmt. Dabei eingesetzt wurde eine Küvette mit der Länge $l = 0.5\text{ dm}$ bei einer Wellenlänge von $\lambda\ 589\text{ nm}$ (Na-D-Linie). Angegeben werden die Konzentration, die Temperatur und das Lösungsmittel.

4.1.2 NMR-Spektroskopie

¹H-NMR-Spektren

¹H-NMR-Spektren wurden mit den Geräten Bruker ARX-300 (300.13 MHz) und Bruker AMX-600 (600.13 MHz) der Firma Bruker-Physik AG, Karlsruhe, aufgenommen. Dabei wurde das Lösungsmittelsignal als interner Standard verwendet:

[D₆]Aceton: 2.05 ppm

[D₆]DMSO: 2.49 ppm

[D₄]Methanol: 3.31 ppm

CDCl₃: 7.26 ppm

Die chemischen Verschiebungen δ_H werden in ppm angegeben, die Kopplungskonstanten J in Hz. Die Multiplizität der Signale werden abgekürzt mit s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), q (Quartett) und m (Multipllett). Zudem werden verbreiterte Signale mit br gekennzeichnet.

¹³C-NMR-Spektren

Die ¹³C-NMR-Messungen wurden mit dem Gerät Bruker AMX-600 (150.93 MHz) der Firma Bruker-Physik AG, Karlsruhe, durchgeführt. Die chemischen Verschiebungen werden in ppm angegeben, bezogen auf das Signal des Lösungsmittels als interner Standard

[D₆]Aceton: 29.8 ppm

[D₆]DMSO: 39.7 ppm,

[D₄]Methanol: 49.0 ppm,

CDCl₃: 77.0 ppm

Zweidimensionale NMR-Spektren

Die Messung der zweidimensionalen Spektren erfolgte mit dem Gerät Bruker AMX-600 (600.13 MHz) der Firma Bruker-Physik AG, Karlsruhe

4.1.3 Massenspektrometrie

EI-MS

Die Massenspektren wurden an den Geräten Finnigan MAT 90 und Finnigan MAT 95 Q aufgenommen. Bei der Messung von EI-Spektren betrug die Elektronenenergie 70 eV und die Ionenquellentemperatur 200° C. Für die Direktproben wurde eine DCI-Schubstange mit Platindraht zum Probenauftrag eingesetzt.

ESI-MS

Bei ESI-Messungen betrug die Spannung der Spraykapillare 3 kV und die Temperatur der Heizkapillare 250° C. Die Proben wurden in Methanol/Wasser im Verhältnis 1:1 gelöst und mittels Fließinjektionsanalyse aufgetragen.

ESI und APCI-MS (Arbeitskreis Prof. M. Spiteller, Universität Dortmund)

Es wurde ein Triplequadrupol-Massenspektrometer Finnigan TSQ 7000 verwendet. Der Massenbereich erstreckte sich von $m/z = 50$ bis $m/z = 800$. Die Spannung des Sekundärvervielfachers war auf 1.0 kV eingestellt. Im APCI-Modus wurde eine APCI2-Ionenquelle eingesetzt, deren Ionisationsspannung 4.5 kV bei einer Kapillartemperatur von 180°C und einer Verdampfertemperatur von 450° C betrug. Als Schießgas wurde Stickstoff mit 40 psi eingesetzt.

Für MS/MS-Messungen wird Argon bei einem Druck von 2.0 Torr als Stoßgas verwendet. Die Spannung des Sekundärvervielfachers lag bei 1.4 kV, die Stoßenergie wurde automatisch auf -20, -30 und -40 eV umgeschaltet.

Im LC/APCI-MS-Modus bzw. LC/ESI-MS-Modus wurde das Massenspektrometer mit einer Dionex-HPLC gekoppelt. Als Säule wurde eine Nucleosil RP 18-Säule der Firma Macherey und Nagel (250 × 2 mm, Porengröße 5 µm) verwendet, die Flußrate betrug 250 µl, die Temperatur 35° C.

4.1.4 Chromatographie

Dünnschichtchromatographie

Analytische Dünnschichtchromatographie wurde auf DC-Aluminiumfolien, beschichtet mit Kieselgel 60 F₂₅₄ oder auf RP 18-beschichteten DC-Aluminiumfolien der Firma Merck durchgeführt.

Die Detektion der Substanzen erfolgte durch Fluoreszenzlöschung bei 254 nm, durch Fluoreszenzanregung bei 366 nm oder durch Anfärbereagenzien wie Eisen(III)chlorid-Lösung (20 mg FeCl₃ in 100 ml Wasser), Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung (100 mg K₃[Fe(CN)₆] in 100 ml Wasser und 2 ml gesättigte NaHCO₃-Lösung), 40%ige Kalilauge, konzentrierte Schwefelsäure oder Ammoniakdampf.

Folgende Laufmittelsysteme wurden verwendet:

- | | |
|---|---|
| System 1 (für SiO ₂ -Platten): | Toluol/Ameisensäureethylester/Ameisensäure 10:5:3 |
| System 2 (für RP 18-Platten): | Acetonitril/Wasser/Ameisensäure 70:100:0.1 |
| System 3 (für SiO ₂ -Platten): | Petrolether/Ethylacetat 1:1 |

Säulenchromatographie

Für die Säulenchromatographie wurden zylindrische Glassäulen mit Keramikfritte (Porengröße G3) verwendet.

Die Gelchromatographie wurde an Sephadex[®] LH 20, Sephadex[®] G10 und Sephadex[®] LH 60 der Firma Pharmacia, Uppsala, Schweden, durchgeführt. Für RP-Chromatographie wurde RP 18-Material mit einer Korngröße von 40-63 µm der Firma Merck eingesetzt.

Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Für die HPL-Chromatographie wurden Lösungsmittel der Firma Merck und Reinstwasser aus einer Filteranlage der Firma Millipore verwendet. Die Lösungsmittel wurden vor der Verwendung gefiltert und entgast.

Zur Probenaufbereitung wurde immer eine Festphasenextraktion an Chromabond[®]-Kartuschen (Größe: 100 und 500 mg, RP 18) der Firma Macherey und Nagel durchgeführt.

Analytische HPLC-Messungen

Analytische HPLC-Messungen wurden an zwei Anlagen der Firma Waters, bestehend aus einem Autosampler mit Injektor, einem Säulenofen, einer Pumpeneinheit, einer Gradientensteuereinheit und einem DAD-Detektor durchgeführt. Die Flußrate betrug immer 1.0 ml/min. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der Millenium Software, Version Millenium 32.

Zur Trennung wurden folgende Säulen und Gradienten verwendet (angegeben sind die internen Nummern des Arbeitskreises Prof. W. Steglich):

Säule Nr. 96: (Fa. Macherey und Nagel), Nucleosil 100 C 18, 5 µm, 250 x 4.0 mm
(Batch N. 6031, Order N. B6Y76, Vertex Column, Serien N. LH 179)

Säule Nr. 98: (Fa. Macherey und Nagel), Nucleosil 100 C 18, 5 µm, 250 x 4.0 mm
(Batch N. 6031, Order N. B6Y76, Vertex Column, Serien N. LH 177)

Säule Nr. 108: (Fa. Knauer), Eurospher 100 C 18, 5 µm, 250 x 4.0 mm, integrierte Vorsäule
(Batch N. B 93277S, Order N. I 6Y535, Vertex Column, Serien N. OL 61)

System 4: Säule: 98
 Laufmittel A: Acetonitril/Wasser (1/9), 0.5 % Tfa
 Laufmittel B: Acetonitril
 Gradient: Start: 100% A, 10 min: 100% A, 50 min: 100% B, 60 min:
 100 % B

System 5:	Säule:	98
	Laufmittel A:	Acetonitril/Wasser (1/9), 0.5 % Tfa
	Laufmittel B:	Acetonitril
	Gradient:	Start: 100% A, 60 min: 100% B, 65 min: 100% B
System 6:	Säule:	98
	Laufmittel A:	Acetonitril/Wasser (1/9), 0.5 % Tfa
	Laufmittel B:	Acetonitril
	Gradient:	Start: 90% A, 10% B, 35 min: 50% A, 50% B, 40 min: 100% B
System 7:	Säule:	98 oder 96
	Laufmittel A:	Acetonitril/Wasser (1/9)
	Laufmittel B:	Acetonitril
	Gradient:	Start: 100% A, 60 min: 100% B, 65 min: 100% B

Semipräparative und präparative HPLC- Trennungen

Semipräparative Trennungen wurden an einer Anlage der Firma Waters durchgeführt, bestehend aus einer Pumpen- und Gradientensteereinheit 600E mit einem U6K-Injektor. Die Detektion erfolgte mit einem Photodioden Array Detektor 990+, bei einer Flußrate von 3.0 ml. Präparative Trennungen wurden an einer Anlage der Firma Waters durchgeführt, die sich aus zwei Pumpen, Modell 590 EF, einem U6K Injektor, einer Gradientensteereinheit 680, einem Variable Wavelength Detektor mit superpräparativer Flußzelle und einem Linienschreiber TY der Firma Knauer zusammensetzt. Die Flußrate betrug 6.80 ml/min. Angegeben ist die jeweilige Detektionswellenlänge.

- Säule Nr. 102: (Fa. Macherey und Nagel), Nucleosil 100 C 18, 5 µm, 250 x 10 mm
(Batch N. 4314, Order N. 715148, Vertex Column, Serien N. LH 179)
- Säule Nr. 92: (Fa. Knauer), Nucleosil 100 C 18, 7 µm, 250 x 16 mm
(Batch N. 4022, Order N. B 10 Y 77, Vertex Column, Serien N. JL87)
- Säule Nr. 100: (Fa. Macherey und Nagel), Nucleosil 100 C 18, 7 µm, 250 x 16 mm
(Batch N. 5094, Order N. B27Y77, Vertex Column, Serien N. LH 104)
- Säule Nr. 106: (Fa. Bischoff), Prontosil 120-5 C 18 SH, 5 µm, 250 x 16 mm
(Batch N. 99, Order N. B0072, Vertex Column)

System 8:	Säule:	102
	Laufmittel A:	Acetonitril/Wasser (1/9)
	Laufmittel B:	Acetonitril

	Gradient:	Start: 90% A, 10% B, 50 min: 100% B
System 9:	Säule:	102
	Laufmittel A:	Acetonitril/Wasser (1/9), 0.5 % Tfa
	Laufmittel B:	Acetonitril
	Gradient:	Start: 90% A, 10% B, 40 min: 60% A, 40% B, 45 min: 100% B
System 10:	Säule:	102
	Laufmittel A:	Acetonitril/Wasser (1/9), 0.5% Tfa
	Laufmittel B:	Acetonitril
	Gradient:	Start: 90% A, 10% B, 40 min: 60% A, 40% B, 45 min: 100% B
System 11:	Säule:	100
	Laufmittel A:	Acetonitril/Wasser (1/9), 0.5% Tfa
	Laufmittel B:	Acetonitril
	Gradient:	Start: 90% A, 10% B, 40 min: 50% A, 50% B, 45 min: 100% B
	Detektion:	265 nm
System 12:	Säule:	92
	Laufmittel A:	Acetonitril/Wasser (1/9), 0.1% Tfa
	Laufmittel B:	Acetonitril
	Gradient:	Start: 100% A, 10 min: 100% A, 50 min: 100% B
	Detektion:	270 nm
System 13:	Säule:	106
	Laufmittel A:	Acetonitril/Wasser (1/9)
	Laufmittel B:	Acetonitril
	Gradient:	Start: 90% A, 10% B, 60 min: 20% A, 80% B, 65 min: 20% A, 80% B, 70 min: 100% B
	Detektion:	400 nm
System 14:	Säule:	100
	Laufmittel A:	Acetonitril/Wasser (1/9), 0.5% Tfa
	Laufmittel B:	Acetonitril
	Gradient:	Start: 80% A, 20% B, 50 min: 45% A, 55% B, 55 min: 100% B
	Detektion:	300 nm

4.2 *Porphyrellus pseudoscaber*

4.2.1 Aufarbeitung

Methode A:

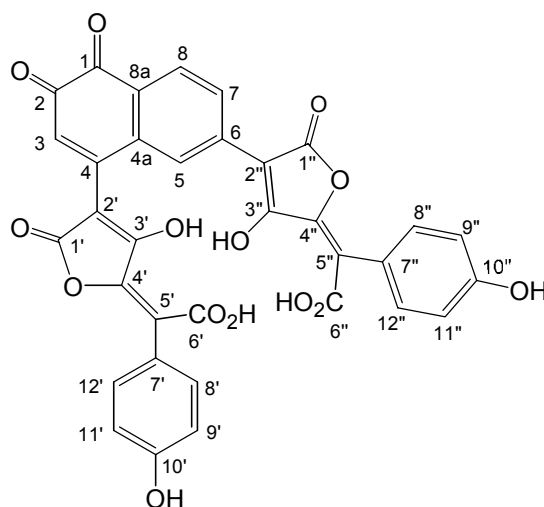
Von frischen Pilzen wird die Haut abgezogen und zusammen mit den Röhren (198 g) in Aceton, unter Zusatz von etwas verdünnter Salzsäure und einer Spatelspitze Ascorbinsäure unter Schutzgasatmosphäre bis zur Farblosigkeit extrahiert. Die Extraktion wird solange wiederholt, bis sich die Lösung auch nach längerem Schütteln nur noch schwach gelb färbt. Aus den Filtraten wird das Lösungsmittel entfernt und der wässrige Rückstand mehrmals gegen Essigsäureethylester ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und bis zur Trockene eingengt. Die noch immer kräftig orange gefärbte Wasserphase wird nun mehrmals mit n-Butanol extrahiert, bis nur noch eine leichte Gelbfärbung vorliegt. Das Butanol wird destillativ entfernt und der Rückstand mit den Ethylacetatextrakten vereinigt. Der braunrote Rückstand (3.57 g) wird in Methanol gelöst und durch zweimalige Säulenchromatographie an Sephadex[®] LH 20 mit Methanol als Eluenten aufgetrennt. Die orangen und roten Fraktionen enthalten die gesuchte Verbindung und werden anschließend durch präparative HPLC an RP 18 gereinigt. Anschließend werden die Fraktionen eingengt und lyophyllisiert.

Man erhält 35.4 mg einer in Lösung roten, als Feststoff schwarzen, metallisch glänzenden Verbindung.

Methode B:

Von einer Kollektion frischer Pilze wird die braune Haut zusammen mit dem Schwammgewebe in Aceton gegeben und mit einigen Tropfen verdünnter Salzsäure 30 min lang extrahiert. Der orange Rohextrakt wird nach starkem Einengen mit etwas Methanol versetzt, über Kartusche filtriert und sofort über präparative HPLC aufgereinigt. Man erhält drei Fraktionen, die nach Entfernen des Acetonitrils an der Lyophylle getrocknet werden.

4.2.2 Bisnorbadiochinon A (31)



Aufarbeitung A

Ausbeute:	35.4 mg (0.018 % der frischen Pilzhaut) schwarzer, metallisch glänzender Feststoff
Schmp.:	117-125° C
Summenformel:	C ₃₄ H ₁₈ O ₁₄ (MG = 650.50)
DC:	R _f (System 2): 0.55 grauviolett mit NH ₃
HPLC:	R _t (System 6): 24.8 min R _t (System 11): 33.6 min
UV/VIS:	λ _{max} (Methanol, pH 7) (log ε) [nm]: 226 (3.59), 258 (3.55), 364 (3.34), 422 (sh, 3.27) λ _{max} (Methanol, pH 1) (log ε) [nm]: 225 (3.57), 266 (3.50), 368 (3.43) λ _{max} (Methanol, pH 13) (log ε) [nm]: 214 (4.16), 245 (3.50), 366 (3.59), 498 (3.10)
IR:	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3436 (ss, br), 1736 (m), 1567 (ss), 1514 (ss), 1464 (s), 1398 (s), 1233 (m), 1176 (m), 1060 (m), 837 (w), 772 (m), 720 (m)
¹ H-NMR:	(600 MHz, [D ₆]DMSO): δ _H [ppm] = 6.44 (s, H-3), 6.73 (d, J= 8.5 Hz, H-9', H-11' oder H-9'', H-11''), 6.76 (d, J= 8.3 Hz, H-9'', H-11'' oder H-9', H-11'), 7.05 (d, J= 8.3 Hz, H-8', H-12' oder H-8'', H-12''), 7.08 (d, J= 8.5 Hz, H-8'', H-12'' oder H-8', H-12'), 7.90 (d, J= 8.0 Hz,

H-8), 8.32 (d, $J = 8.0$ Hz, H-7), 8.52 (s, H-5), 9.53 (s, br, OH), 9.56 (s, br, OH) *

^{13}C -NMR: (150 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ_{C} [ppm] = 94.1 (C-2''), 94.6 (C-2'), 115.3 (C-9', C-11'), 115.4 (C-9'', C-11''), 118.8 (C-5''), 119.0 (C-5'), 126.2 (C-7), 127.0 (C-7''), 127.1 (C-5), 127.2 (C-7'), 127.3 (C-3), 128.5 (C-8a), 130.2 (C-8), 132.6 (C-8', C-12'), 132.7 (C-8'', C-12''), 134.8 (C-4a), 141.6 (C-6), 150.0 (C-4), 152.5 (C-4''), 152.6 (C-4'), 157.8 (C-10'), 157.9 (C-10''), 167.6 (C-3''), 167.7 (C-3'), 168.7 (C-1''), 169.4 (C-1'), 175.6 (C-6''), 175.9 (C-6'), 179.9 (C-1), 181.7 (C-2) *

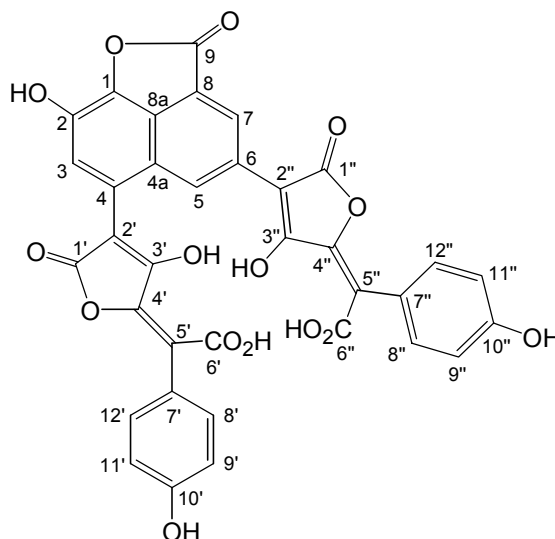
*: Die Signale der Pulvinsäure-Seitenketten sind, bis auf die Signal der Kohlenstoffe C-2' und C-2'', nicht eindeutig zuzuordnen.

Diese Zuordnung orientiert sich an Literaturwerten^[39].

(-)-ESI-MS: m/z (%): 649 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (39), 324 $[\text{M}-2\text{H}]^{-2}$ (100)

HR-ESI-MS: gef.: 649.0618 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ber.: 649.0618

4.2.3 Norbadion A (30)



Aufarbeitung B

Ausbeute: 1.30 mg oranger Feststoff

Summenformel: $\text{C}_{35}\text{H}_{18}\text{O}_{15}$ (MG = 678.51)

DC: R_f (System 1): 0.13

R_f (System 2): 0.47

lachsfarben mit NH_3 konz.

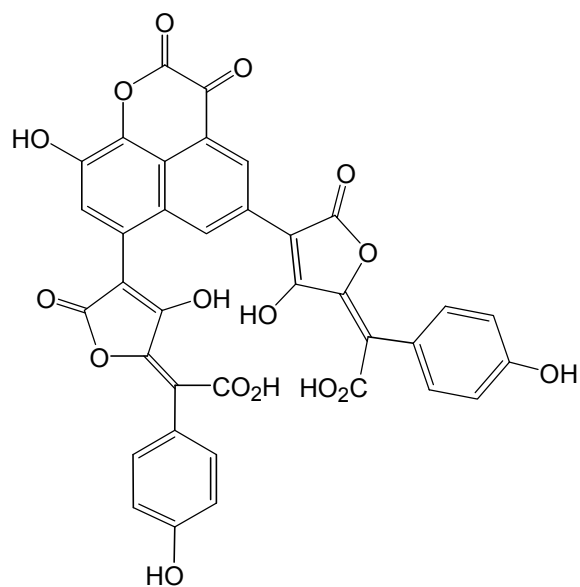
HPLC:	R_t (System 7): 22.6 min R_t (System 10): 30.1 min
UV/VIS:	λ_{\max} (Methanol) [nm]: 227, 268, 366, 410 (sh)
$^1\text{H-NMR}$:	(600 MHz, $[\text{D}_4]$ Methanol): δ_{H} [ppm] = 6.84 (d, J = 8.0 Hz, H-9', H-11' oder H-9'', H-11''), 6.87 (d, J = 8.0 Hz, H-9', H-11' oder H-9'', H-11''), 7.22 (d, J = 8.0 Hz, H-8', H-12' oder H-8'', H-12''), 7.32 (d, J = 8.0 Hz, H-8', H-12' oder H-8'', H-12''), 7.44 (s, H-3), 9.06 (s, H-7), 9.15 (s, H-5)

4.2.4 Bisnorbadiochinon A (31)

Aufarbeitung B

Ausbeute	3.2 mg
Summenformel	$\text{C}_{34}\text{H}_{18}\text{O}_{14}$ (MG = 650.50)
DC	R_f (System 2): 0.55 violett mit NH_3 konz.
HPLC	R_t (System 7): 20.5 min R_t (System 10): 28.6 min
$^1\text{H-NMR}$	(600 MHz, $[\text{D}_4]$ Methanol) δ_{H} [ppm] = 6.61 (s, H-3), 6.82 (d, H-9', H-11' oder H-9'', H-11''), 6.85 (d, H-9', H-11' oder H-9'', H-11''), 7.19 (d, H-8', H-12' oder H-8'', H-12''), 7.28 (d, H-8', H-12' oder H-8'', H-12''), 8.08 (d, H-8), 8.45 (d, H-7), 8.73 (s, H-5)

Weitere analytische Daten: siehe Kapitel 4.2.2

4.2.5 Badion A (29)**Aufarbeitung B**

Ausbeute: 0.4 mg

Summenformel: $C_{19}H_{14}O_{10}$ (MG = 706.52)

DC: R_f (System 2): 0.48

rotbraun mit Kaliumhexacyanoferratlösung

grün mit NH_3

HPLC: R_t (System 7): 18.2 min

R_t (System 10): 25.3 min

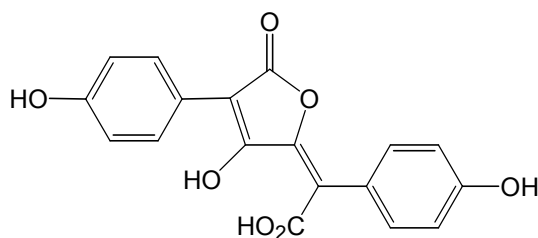
UV/VIS: λ_{max} (Methanol) [nm]: 220, 263, 364, 505 (sh)

4.3 *Xanthoconium affine*

4.3.1 Isolierung der Farbstoffe

Von den luftgetrockneten Pilzen wird die Huthaut abgeschält (17.0 g) und in Aceton, einigen Tropfen verdünnter Salzsäure und etwas Ascorbinsäure unter Schutzgasatmosphäre erschöpfend extrahiert. Die orangefarbenen Extrakte werden im Vakuum eingeeengt, mit Wasser versetzt und mehrmals gegen Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der verbleibende Rückstand (2.46 g) wird in Acetonitril/Wasser im Verhältnis 1:1 gelöst und durch Festphasenextraktion an RP 18 von unpolaren Verunreinigungen befreit. Durch Trennung mittels präparativer HPLC und anschließender Reinigung durch semipräparative HPLC erhält man die Verbindungen **14**, **30** und **31** in analysenreiner Form.

4.3.2 Atromentinsäure (**14**)



Ausbeute: 1.30 mg (0.008 % der getrockneten Huthaut)

gelber Feststoff

Summenformel: $C_{12}H_{12}O_7$ (MG = 340.28)

DC: R_f (System 1): 0.46

keine Veränderung mit NH_3 oder Kaliumhexacyanoferratlösung

HPLC: R_t (System 7): 16.2 min

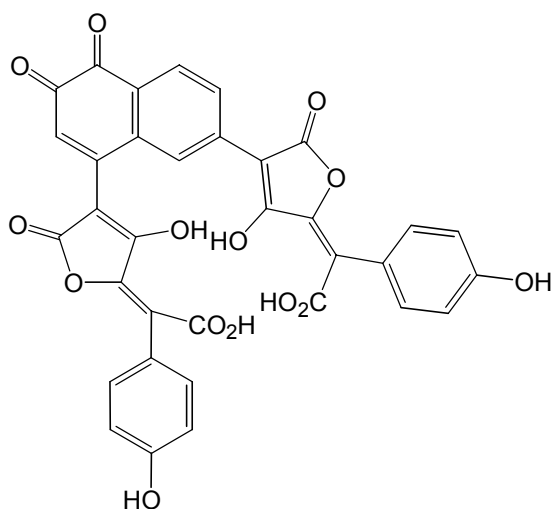
R_t (System 9): 27.4 min

R_t (System 11): 25.0 min

UV/VIS: λ_{max} (HPLC) [nm]: 225, 262, 359

1H -NMR: (600 MHz, $[D_6]DMSO$): δ [ppm] = 6.72 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.74 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.04 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.07 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 9.95* (s, OH), 10.37* (s, OH)

* = austauschbare Protonen

4.3.3 Bisnorbadiochinon A (31)

Ausbeute: 3.50 mg (0.021 % der getrockneten Huthaut)

schwarzer, metallisch glänzender Feststoff

Summenformel: $C_{34}H_{18}O_{14}$ (MG = 650.50)

DC: R_f (System 2): 0.55

violett mit NH_3

HPLC: R_t (System 7): 20.1 min

R_t (System 9): 30.4 min

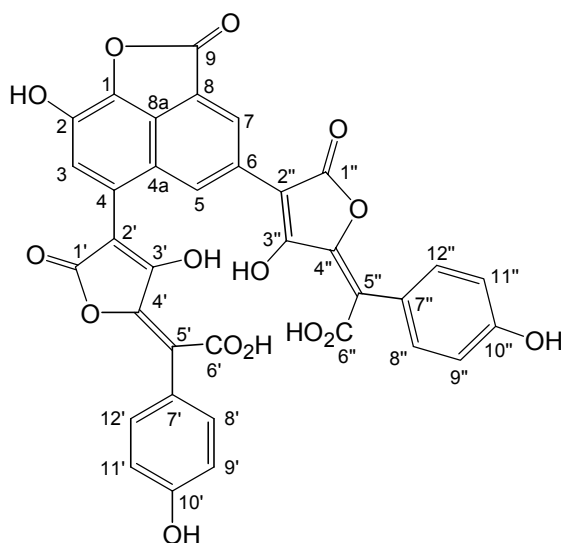
R_t (System 11): 33.2 min

UV/VIS: λ_{max} (HPLC) [nm]: 229, 262, 346, 420 (sh)

1H -NMR: (600 MHz, $[D_4]$ Methanol): δ_H [ppm] = 6.46 (s, 1H), 6.73 (d, 2H), 6.78 (d, 2H), 7.07 (d, 2H), 7.17 (dd, 2H), 7.92 (d, 1H), 8.34 (dd, 1H), 8.50 (d, 1H)

Weitere analytische Daten: siehe Kapitel 4.2.2

4.3.4 Norbadion A (30)



Ausbeute: 2.2 mg (0.013 % der getrockneten Huthaut)

orangefarbener Feststoff

Summenformel: $C_{35}H_{18}O_{15}$ (MG = 678.51)

DC: R_f (System 2): 0.47

lachsfarben mit NH_3

HPLC: R_t (System 7): 24.1 min

R_t (System 9): 34.3 min

R_t (System 11): 35.4 min

UV/VIS: λ_{max} (Methanol) ($\log \epsilon$) [nm]: 223 (3.84), 267 (3.91), 363 (3.65), 418 (3.50)

IR: (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3436 (m), 1752 (s), 1610 (s), 1560 (s), 1514 (s), 1391 (s), 1231 (s), 1176 (s), 1058 (s)

1H -NMR: (600 MHz, $[D_6]DMSO$): δ_H [ppm] = 6.75 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 6.79 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.07 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.16 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.35 (s, 1H), 8.99 (s, 1H), 9.00 (s, 1H)

4.4 *Boletus erythropus*

4.4.1 Aufarbeitung der Pilzhäute

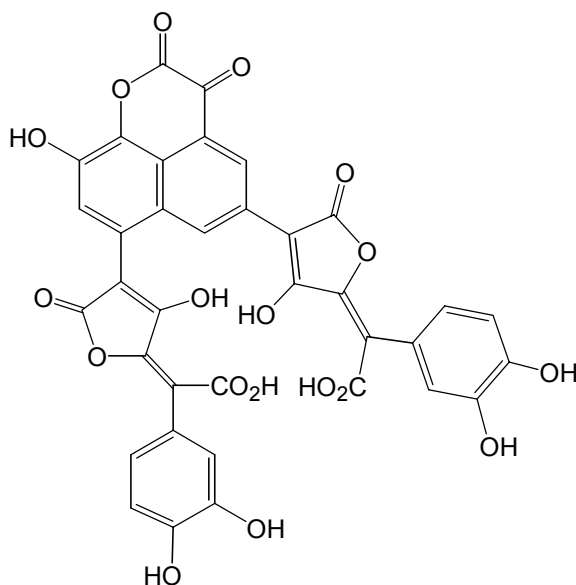
Die getrockneten Huthäute (14.0 g) werden in ca. 100 ml dest. Wasser für 30 min eingeweicht und anschließend mit leicht salzsaurem Aceton und einer Spatelspitze Ascorbinsäure extrahiert. Die Extraktion wird mit neuem Lösungsmittel wiederholt, bis die Pilzreste nur noch schwach hellbraun gefärbt sind. Aus den braunorange gefärbten Lösungen wird das Aceton destillativ entfernt und der wäßrige Rückstand mehrmals gegen Ethylacetat ausgeschüttelt. Die weiterhin gelb gefärbte Wasserphase wird nochmals mit n-Butanol extrahiert, bis nur noch eine schwache Gelbfärbung vorhanden ist. Die vereinigten organischen Phasen werden bis zur Trockene eingeeengt und in wenig Methanol gelöst. Nach Filtration über RP 18-Kartusche wird die Lösung an Sephadex[®] LH 20 mit Methanol als Eluent getrennt. Die ersten, braungelben Fraktionen, die nur sehr polare Substanzen wie Zucker enthalten, werden verworfen. Die zweite, gelbe Bande besteht aus Variegatsäure (**17**), die mittels Coinjektion identifiziert wird. Die gesuchten Verbindungen sind, neben Badion B (**32**), in der folgenden, orangen, dann rotgefärbten Fraktion enthalten. Die letzte Bande enthält vor allem Ergosterol. Die weitere Trennung der dritten Fraktion wird mittels präparativer und semipräparativer HPLC durchgeführt, man erhält 9.2 mg der Verbindung **beb1**, 27.5 mg Badion B (**32**) und 10.3 mg der dritten Substanz **beb3**.

4.4.2 Farbstoff beb1

Ausbeute:	9.2 mg (0.066% der getrockneten Huthaut) rotbrauner Feststoff
Schmp.:	135-140° C (Zers.)
DC:	R_f (System 2): 0.48 orange mit NH ₃
HPLC:	R_t (System 5): 19.4 min R_t (System 11): 34.7 min
UV/VIS:	λ_{\max} (Methanol) [nm]: 208 (3.41), 271 (3.16), 392 (2.88)
IR:	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3401 (s), 3208 (sh), 2258 (w), 2129 (w), 1767 (s), 1610 (s), 1604 (s), 1516 (m), 1283 (s), 1231 (s), 1043 (m), 1023 (s), 997 (s), 825 (w), 767 (w)

$^1\text{H-NMR}$:	(600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ_{H} [ppm] = 6.52 (dd, J = 1.6, 8.0 Hz, 1H), 6.67 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 6.69 (d, J = 8.0 Hz), 6.73 (d, br, 1H), 6.77 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.91 (s, br, 1H), 7.01 (s, OH), 7.10 (s, OH), 7.17 (s, 1H), 7.18 (s, OH), 8.71 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 10.48 (s, OH)
$^{13}\text{C-NMR}$:	(150 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ_{C} [ppm] = 96.0 (C_q), 98.2 (C_q), 114.8 (CH), 115.3 (CH), 117.5 (CH), 118.1 (CH), 118.2 (C_q), 118.3 (C_q), 119.7 (C_q), 121.7 (CH), 121.8 (CH), 122.6 (CH), 123.3 (C_q), 123.5 (C_q), 123.8 (CH), 125.2 (C_q), 125.7 (C_q), 125.8 (C_q), 126.6 (C_q), 126.7 (CH), 130.2 (C_q), 137.9 (C_q), 144.3 (C_q), 144.8 (C_q), 145.0 (C_q), 145.8 (C_q), 147.1 (C_q), 151.5 (C_q), 167.4 (CO), 167.7 (CO), 167.9 (CO), 168.6 (2 \times CO), 169.0 (CO), 170.9 (CO)
ESI-MS:	m/z (%): 760 $[\text{M}]^+$ (66), 498 (100), 480 (43), 236 (17), 235 (51)

4.4.3 Badion B (32)



Ausbeute:	27.5 mg (0.20 % in der getrockneten Huthaut) schwarzer, metallisch glänzender Feststoff
Summenformel:	$\text{C}_{36}\text{H}_{18}\text{O}_{16}$ (MG = 738.52)
DC:	R_f (System 2): 0.48 grün mit NH_3 konz.
HPLC:	R_t (System 5): 21.4 min R_t (System 11): 36.4 min
UV/VIS:	λ_{max} (HPLC) [nm]: 230, 276, 378, 505 (sh)

$^1\text{H-NMR}$: (600 MHz, $[\text{D}_4]\text{Methanol}$): δ_{H} [ppm] = 6.74 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 6.82 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.85 (s, br, 1H), 6.86 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.91 (dd, J = 1.8, 8.0 Hz), 7.06 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.44 (s, 1H), 9.15 (s, br, 1H), 9.34 (s, br, 1H)

4.4.4 Verbindung beb3

Ausbeute: 10.3 mg (0.093 % in der getrockneten Huthaut)
rötlich-brauner Feststoff

Schmp.: 120-125° C (Zers.)

DC: R_{f} (System 2): 0.48
orange mit NH_3

HPLC: R_{t} (System 5): 24.2 min
 R_{t} (System 11): 39.9 min

UV/VIS: λ_{max} (Methanol) [nm]: 215 (3.19), 268 (3.17), 374 (2.96)

IR: (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3429 (s), 3208 (sh), 2258 (w), 2129 (w), 1758 (s), 1604 (s), 1517 (m), 1390 (m), 1283 (s), 1023 (m), 1048 (s), 997 (s), 825 (m), 766 (m)

$^1\text{H-NMR}$: (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ_{H} [ppm] = 6.52 (dd, J = 1.0, 7.0 Hz, 1H), 6.66 (s, br, 1H), 6.70 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 6.73 (dd, J = 1.6, 7.7 Hz, 1H), 6.78 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 6.88 (s, br, 1H), 6.98 (s, OH), 7.07 (s, OH), 7.15 (s, OH), 7.30 (s, 1H), 9.01 (s, 1H), 9.22 (s, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$: (150 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ_{C} [ppm] = 94.8 (C_{q}), 96.9 (C_{q}), 114.7 (CH), 115.2 (CH), 117.5 (CH), 118.0 (CH), 118.2 (CH), 118.3 ($2\times\text{C}_{\text{q}}$), 121.6 (CH), 121.7 (CH), 123.3 (C_{q}), 124.6 (CH), 125.2 (CH), 126.6 (C_{q}), 128.3 (C_{q}), 128.7 (CH), 131.2 (C_{q}), 131.5 (C_{q}), 136.9 (C_{q}), 144.2 (C_{q}), 144.7 (C_{q}), 144.9 (C_{q}), 145.7 (C_{q}), 147.6 (C_{q}), 151.3 (C_{q}), 167.0 (CO), 167.3 (CO), 167.4 (CO), 168.2 (CO), 168.3 (CO), 168.8 (CO), 168.9 (CO), 171.7 (CO)

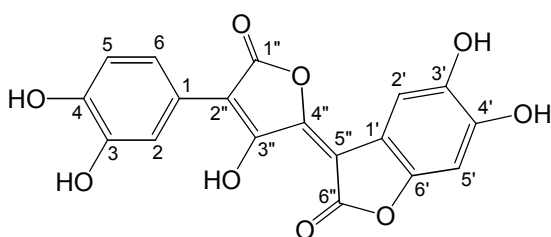
APCI-MS: m/z (%): 740 $[\text{M}]^+$ (100), 599 (100), 336 (15), 263 (21), 245 (6)

4.5 *Leccinum chromapes*

4.5.1 Isolierung

Um den roten Farbstoff in möglichst hoher Konzentration zu erhalten, wird von den getrockneten Pilzen die Huthaut abgetrennt (24.7 g) und mit etwas Wasser versetzt. Nach kurzem Stehen wird mit leicht salzsaurem Aceton (pH-Wert 5) unter Zusatz von etwas Ascorbinsäure mehrmals bis zur Farblosigkeit extrahiert (jeweils ca. 900 ml). Aus den orangefarbenen Extrakten wird das Lösungsmittel bei 40° C entfernt und der wäßrige Rückstand mehrmals gegen Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels bleibt ein braunroter Rückstand (1.85 g), der in einer Aceton/Methanol-Mischung im Verhältnis 4:1 gelöst wird und mit diesem Eluenten an Sephadex[®] LH 20 chromatographiert wird. Man erhält drei Fraktionen, von denen zwei den roten Farbstoff enthalten. Die weitere Trennung und Reinigung erfolgt mittels präparativer HPLC an RP 18-Material. Man erhält neben den beiden Pulvinsäuren Atromentinsäure (**14**) und Isoxerocomsäure (**16**), 9.6 mg **18** als tiefroten Feststoff und 8.70 mg des blaßgelben Öles **77**. Aus diesem entsteht nach längerem Stehen in geringen Mengen eine gelbe Verbindung **84**, welche wiederum durch HPLC an RP 18 isoliert werden kann.

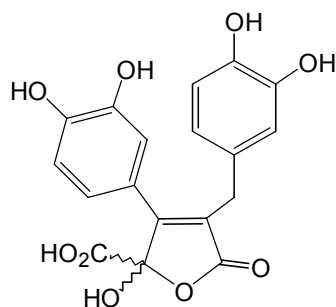
4.5.2 Hutfarbstoff Variegatorubin (**18**)



Ausbeute:	9.6 mg (0.039 % in der getrockneten Huthaut) tiefroter Feststoff
Schmp.:	270° C (Zers.)
Summenformel:	C ₁₈ H ₁₀ O ₉ (MG = 370.27)
DC:	R _f (System 1): 0.46 R _f (System 2): 0.08 keine Reaktion mit Kaliumhexacyanoferrat

HPLC:	R_t (System 10): 27.1 min R_t (System 12): 35.1 min
UV/VIS:	λ_{\max} (HPLC) [nm]: 276, 362 (sh), 499
IR	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3436 (m, br), 2927 (s), 1729 (s), 1640 (s), 1618 (s), 1331 (s), 1310 (s), 1210 (s), 1107 (s), 1027 (s)
$^1\text{H-NMR}$:	(600 MHz, $[\text{D}_6]\text{Aceton}$): δ_{H} [ppm] = 6.88 (s, H-5'), 6.95 (d, J = 8.2 Hz, H-5), 7.36 (s, H-2'), 7.64 (dd, J = 1.8, 8.2 Hz, H-6), 7.78 (s, br, H-2)
EI-MS:	m/z (%): 370 $[\text{M}]^+$ (46), 330 (11), 328 (27), 300 (21), 286 (12), 283 (9), 165 (12), 150 (23), 149 (9), 123 (22), 69 (8), 44 (100)
HR-EI-MS:	gef.: 370.0318 ber.: 370.0318

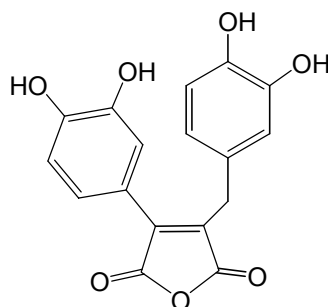
4.5.3 Chromapedsäure (77)



Ausbeute:	8.7 mg (0.032 % der getrockneten Huthaut) gelbliches Öl
Summenformel:	$\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_9$ (MG = 374.30)
DC:	R_f (System 1): 0.07 blaugrün mit FeCl_3 , keine Reaktion mit Ninhydrin
HPLC:	R_t (System 10): 13.2 min R_t (System 12): 16.3 min
UV/VIS:	λ_{\max} (Methanol) ($\log \epsilon$) [nm]: 211 (3.49), 249 (3.22), 296 (3.18), 304 (3.19), 323 (3.19)
Drehwert :	$[\alpha]_D^{20} = +4$ ($c = 1.6$, CH_3CN)
IR:	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3435 (ss), 2924 (w), 1757 (w), 1629 (m), 1521 (w), 1287 (w), 1024 (w), 997 (w)

- $^1\text{H-NMR}$: (600 MHz, $[\text{D}_4]\text{Methanol}$): siehe Kapitel 3.4.6
(600 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ_{H} [ppm] = 3.65 (unter Wassersignal), 6.44 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.60 (dd, $J = 1.8, 8.0$ Hz, 1H), 6.62 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.75 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.93 (dd, $J = 2.1, 8.3$ Hz, 1H), 7.12 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 8.78 (s, br, 2 \times OH), 9.20 (s, br, OH), 9.65 (s, br, OH)
- $^{13}\text{C-NMR}$: (150 MHz, $[\text{D}_4]\text{Methanol}$): δ_{C} [ppm] = siehe Kapitel 3.4.6

4.5.4 Oxidationsprodukt 84



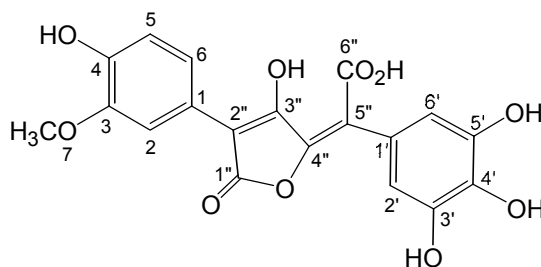
- Ausbeute: 0.3 mg
gelber Feststoff
- Summenformel: $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_7$
- DC: R_{f} (System 1): 0.47
- HPLC: R_{t} (System 10): 15.4 min
 R_{t} (System 12): 33.6 min
- UV/VIS: λ_{max} (HPLC) [nm]: 207, 272, 384
- $^1\text{H-NMR}$: (600 MHz, CD_3CN): δ_{H} [ppm] = 3.85 (s, 2H), 6.60 (dd, $J = 1.7, 7.8$ Hz, 1H), 6.73 (s, 1H), 6.74 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 6.93 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.12 (dd, $J = 2.2, 8.3$ Hz, 1H), 7.17 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H)
- EI-MS: m/z (%): 328 $[\text{M}]^+$ (82), 310 (40), 282 (18), 255 $[\text{M}-\text{CO}, -\text{CO}_2\text{H}]^+$ (100), 239 (15), 237 (14), 210 (25), 181 (11), 163 (18), 152 (54), 133 (7)
- HR-EI-MS: gef.: 328.0583 ber.: 328.0474

4.6 *Boletus griseus*

4.6.1 Extraktion der Farbstoffe

Die getrockneten Pilzfruchtkörper (20.9 g) werden pulverisiert und mehrmals mit je 900 ml Aceton, versetzt mit etwas Wasser, bis zur Farblosigkeit extrahiert. Das Lösungsmittel wird bei 40° C im Vakuum destillativ entfernt, der braune Rückstand (insgesamt 1.35 g) in leicht salzsaurem Wasser gelöst und mehrmals gegen Ethylacetat ausgeschüttelt. Dabei bleibt die Wasserphase schwach hellgelb. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und bis zur Trockene eingengt. Die gelbbraune, zähe Masse (insgesamt 0.45 g) wird in wenig Acetonitril/Wasser (Verhältnis 1:1) gelöst, über RP 18-Kartusche gegeben und anschließend mittels präparativer HPLC getrennt und durch semipräparative HPLC gereinigt. Man erhält die beiden Verbindungen **bgr1** und **bgr2** in analysenreiner Form.

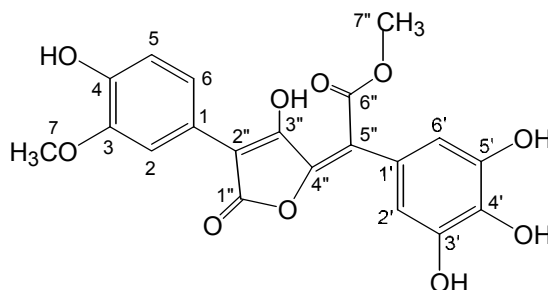
4.6.2 Pulvinsäurederivat 86



Ausbeute:	3.58 mg (0.017% des getrockneten Pilzes) gelbbrauner Feststoff
Schmp.:	105-110° C
Summenformel:	C ₁₉ H ₁₄ O ₁₀ (MG = 402.13)
DC:	R _f (System 1): 0.23 rotbraun mit Kaliumhexacyanoferrat
HPLC:	R _t (System 4): 21.1 min R _t (System 9): 25.4 min R _t (System 11): 15.3 min
UV/VIS:	λ _{max} (Methanol) (log ε) [nm] : 212 (3.97), 263 (3.73), 340 (3.28, sh), 394 (3.37)
IR:	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3436 (m, br), 2924 (w), 2854 (w), 1635 (w)

$^1\text{H-NMR}$:	(600 MHz, $[\text{D}_6]\text{Aceton}$): δ [ppm] = 3.84 (s, CH_3), 6.38 (s, H-2', H-6'), 6.80 (d, $J = 8.3$ Hz, H-3), 7.79 (dd, $J = 1.9, 8.3$ Hz, H-6), 8.00 (d, $J = 1.7$ Hz, H-2)
$^{13}\text{C-NMR}$:	(150 MHz, $[\text{D}_6]\text{Aceton}$): δ [ppm] = 55.7 (CH_3), 97.8 (C-2''), 110.3 (C-2, 2', 6'), 114.7 (C-5), 118.3 (C-5''), 119.9 (C-6), 125.0 (C-1), 127.0 (C-1'), 132.5 (C-4'), 144.8 (C-3', 5'), 145.0 (C-4), 147.2 (C-3), 153.3 (C-4''), 167.8 (C-3''), 168.9 (C-1''), 170.0 (C-6'')
(-)-ESI-MS	m/z (%): 401 (33) $[\text{M-H}]^-$
HR-(-)-ESI-MS:	gef.: 401.0514 gem.: 401.0509

4.6.3 Pulvinsäurederivat 88

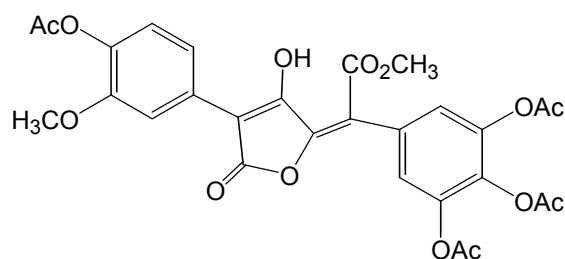


Ausbeute:	1.31 mg (0.006 % des getrockneten Pilzes) oranger Feststoff
Schmp.:	140° C (Zers.)
Summenformel:	$\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_{10}$ (MG = 416.31)
DC:	R_f (System 1): 0.24 rotbraun mit Kaliumhexacyanoferrat
HPLC:	R_t (System 4): 26.5 min R_t (System 9): 24.6 min R_t (System 11): 33.4 min
UV/VIS:	λ_{max} (Methanol) (log ϵ) [nm]: 212 (4.24), 258 (4.02), 337 (3.93), 385 (3.74, sh)
IR:	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3436 (s), 2928 (w), 1681 (m), 1629 (m), 1384 (w), 1209 (m), 1180 (m), 1132 (w)
$^1\text{H-NMR}$:	(600 MHz, $[\text{D}_6]\text{Aceton}$): δ [ppm] siehe Kapitel 3.5.5
$^{13}\text{C-NMR}$:	(150 MHz, $[\text{D}_6]\text{Aceton}$): δ [ppm] siehe Kapitel 3.5.5
(-)-ESI-MS:	m/z (%): 415 $[\text{M-H}]^-$ (49)
HR-(-)-ESI-MS	gef.: 415.0633 ber.: 415.0665

4.6.4 Acetylierung

Von den Verbindungen **86** und **88** werden 0.5 bzw. 0.8 mg in ca. 2 ml Acetanhydrid gelöst, eine Spatelspitze DMAP zugesetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach dünnschichtchromatographischer Kontrolle wird mit etwas Wasser versetzt und gegen Diethylether ausgeschüttelt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der Rückstand wird lyophyllisiert und anschließend massenspektrometrisch untersucht. Die Verbindung **86** kann unter diesen Bedingungen nicht acetyliert werden. **88** wird zum Tetraacetat **89** umgesetzt.

4.6.5 Acetylierungsprodukt **89**



Summenformel: C₂₈H₂₄O₁₄ (MG = 584.48)

(-)-ESI-MS: *m/z* (%): 583 (79) [M-H]⁻, 499 (100)

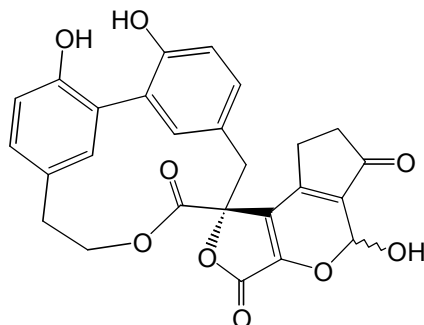
HR-(-)-ESI-MS ber.: 583.1078 gem. ber.: 583.1088

4.7 *Boletus retipes/ornatipes*

4.7.1 Isolierung der Inhaltsstoffe

Die Kollektionen, die die gesuchte Verbindung in größeren Mengen enthalten, werden in Portionen zu ca. 2 g zerkleinert und unter Schutzgasatmosphäre mit leicht salzsaurem Aceton extrahiert. Die dunkelgelben bis braunschwarzen Extrakte werden bei Raumtemperatur stark eingeeengt, mit Wasser versetzt und gegen Ethylacetat ausgeschüttelt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird der schwarze Rückstand in Acetonitril/Wasser im Verhältnis 1:1 gelöst, über Kartusche filtriert und umgehend mittels präparativer HPLC an RP 18 getrennt. Mitunter wird auch der Acetonextrakt nach dem Einengen ohne vorherige Extraktion mit Ethylacetat direkt für die Trennung an der HPLC aufbereitet. Die Extrakte und HPLC-Fractionen werden bis zur weiteren Verwendung tiefgekühlt. Aus den Fractionen der präparativen Trennung wird das Lösungsmittel bei Raumtemperatur entfernt und das Wasser durch Lyophilisieren entzogen. Man erhält die Verbindungen **57** und **94** in reiner Form, die Aufbewahrung bis zur Messung erfolgt ebenfalls bei -10°C .

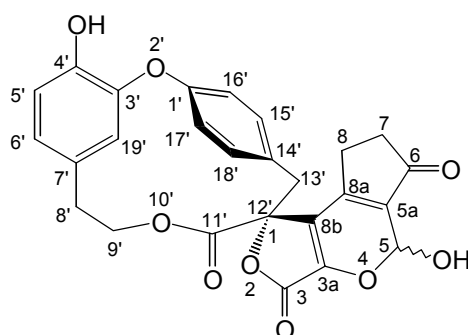
4.7.2 Isoretipolid A (**94**)



Ausbeute:	15.8 mg (0.047 % des getrockneten Pilzes) blaßgelbes Pulver
Summenformel:	$\text{C}_{34}\text{H}_{18}\text{O}_{14}$ (MG = 476.43)
Schmp.:	120°C (Zers.)
DC:	R_f (System 1): 0.55
HPLC:	R_t (System 6): 20.9 min R_t (System 14): 48.6 min
Drehwert:	$[\alpha]_D^{20} = +144$ ($c = 0.1$, CH_3CN)

UV/VIS:	λ_{\max} (CH ₃ CN) [nm]: 211 (3.54), 302 (3.14)
CD:	λ_{\max} (CH ₃ CN) [$\Delta\epsilon$]: 203 (-2.703), 219 (0), 234 (2.503), 266 (1.464), 296 (2.502)
IR:	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3436 (ss, br), 1779 (m), 1728 (m), 1684 (m), 1637 (m), 1512 (w), 1266 (w), 1209 (w), 1026 (w)
¹ H-NMR:	(600 MHz, [D ₆]Aceton): δ_{H} [ppm] siehe Tabelle 4, Kapitel 3.6.6
¹³ C-NMR:	(150 MHz, [D ₆]Aceton): δ_{C} [ppm] siehe Tabelle 5, Kapitel 3.6.6

4.7.3 Retipolid A (57)



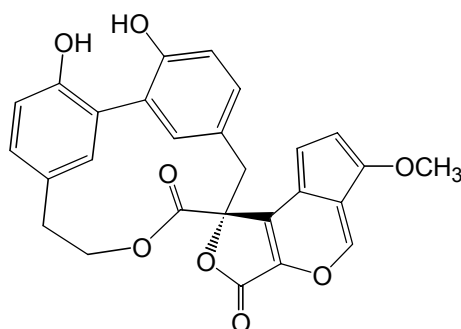
Ausbeute:	78 mg (0.233 % des getrockneten Pilzes) gelber Feststoff
Summenformel:	C ₃₄ H ₁₈ O ₁₄ (MG = 476.43)
DC:	R_f (System 1): 0.53
HPLC:	R_t (System 6): 21.60 min R_t (System 14): 50.4 min
UV/VIS:	λ_{\max} (CH ₃ CN) [nm]: 210, 289 (sh), 310
¹ H-NMR:	(600 MHz, [D ₆]Aceton): δ_{H} [ppm] = 2.58 (m, 1H), 2.61 (m, 1H), 2.85 (dd, J = 11.1 Hz, 2H), 3.29 (m, 1H), 3.32 (m, 1H), 3.38 (m, 1H), 3.90 (m, 1H), 4.01 (dd, J = 4.4, 4.6 Hz, 1H), 4.12 (m, 1H), 4.84 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 6.51 (d, J = 6.7 Hz, 1H), 6.71 (dd, J = 3.9, 8.0 Hz, 1H), 7.01 (dd, J = 2.2, 8.3 Hz, 1H), 7.25 (dd, J = 2.2, 8.3 Hz, 1H), 7.35 (dd, J = 2.2, 8.3 Hz, 1H), 7.67 (dd, J = 1.9, 8.3 Hz, 1H), 8.35 (s, br, 1H)
¹³ C-NMR:	(150 MHz, [D ₆]Aceton): δ_{C} [ppm] = 25.6 (C-8), 31.5 (C-8'), 35.4 (C-7), 43.5 (C-13'), 69.4 (C-9'), 87.2 (C-1/12'), 94.1 (C-5), 115.8 (C-19'), 116.0 (C-5'), 121.8 (C-6'), 124.8 (C-16'), 124.9 (C-17'), 127.7

(C-8b), 131.8 (C-7'), 132.2 (C-14'), 132.9 (C-18'), 133.6 (C-15'),
 134.0 (C-3a), 144.0 (C-4'), 144.1 (C-5a), 151.9 (C-3'), 158.1 (C-8a),
 159.3 (C-1'), 163.4 (C-3), 168.0 (C-11'), 203.2 (C-6)

4.7.4 Derivatisierung zum Isoretipolid A-Methoxyfulven

Von dem Naturstoff **94** werden 0.6 mg in 3 Tropfen Methanol gelöst und umgehend mit 1 ml einer *p*-Toluolsulfonsäure-Lösung (1% in Dimethoxypropan) versetzt. Nach 25 minütigem refluxieren bei 75° C wird das Lösungsmittel entfernt und der orangebraune Rückstand mit Ethylacetat/Petrolether 1:1 an Kieselgel getrennt.^[61] Aufgrund der geringen Menge wird dazu eine mit Kieselgel gefüllte Pasteurpipette eingesetzt. Die orangefarbene Fraktion wird einrotiert und massenspektrometrisch untersucht. Man erhält 0.3 mg Isoretipolid A-Methoxyfulven (**96**) als oranges Öl.

4.7.5 Isoretipolid A-Methoxyfulven (96)



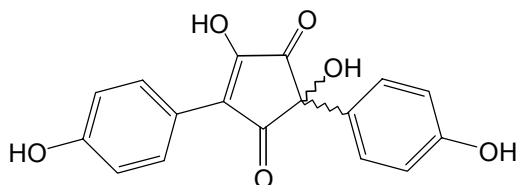
Summenformel:	$C_{27}H_{20}O_8$ (MG = 472.45)
Ausbeute:	0.3 mg
DC:	R_f (System 3): 0.40
UV/VIS:	λ_{max} (CH ₃ CN) [nm]: 216, 285, 385
EI-MS:	m/z (%): 472 (3), 225 (9), 73 (100)
HR-EI-MS	ber.: 472.1137 gem. ber.: 472.1158

4.8 *Boletus longicurvipes*

4.8.1 Extraktion der Pilzstiele

Die Stiele der getrockneten Pilze werden von den Fruchtkörpern abgetrennt (64.9 g) und im Ganzen in Petrolether dreißig Minuten auf dem Schüttelbad entfettet. Nach Abfiltrieren des Lösungsmittels werden die Stiele in leicht salzsaures Aceton gegeben, zerkleinert und mehrmals unter Schutzgasatmosphäre extrahiert (je 700 ml), bis die Stielreste keine Gelbfärbung mehr mit Lauge zeigen. Die gelbbraunen Extrakte werden eingeeengt, mit Wasser versetzt und mehrmals gegen Essigsäureethylester ausgeschüttelt. Nach Trocknen der vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel im Vakuum bei 40° C entfernt. Der braune Rückstand (5.87 g) wird in 70%igem Methanol im Ultraschallbad gelöst und zweimal über Sephadex® LH 20 mit Methanol/Wasser (7:3) als Eluenten und einem geringem Zusatz von verdünnter Salzsäure aufgetrennt. Die zweite, gelbe Fraktion (136 mg) wird am Rotationsverdampfer eingeeengt und lyophyllisiert. Der Rückstand wird in Acetonitril gelöst und mittels Festphasenextraktion an RP 18 für die Aufreinigung an der präparativen HPLC vorbereitet. Im Anschluß an die Trennung werden die Fraktionen eingeeengt und an der Lyophylle getrocknet.

Man erhält 92.8 mg eines gelben Feststoffes.

4.8.2 Gyroporin (39)

Ausbeute:	92.8 mg (0.143 % der getrockneten Pilzstiele) blaßgelbes Pulver
Summenformel:	$C_{17}H_{12}O_6$ (MG = 312.27)
DC:	R_f (System 1): 0.39 blaugrün mit konz. H_2SO_4 chromgelb mit KOH blau nach längerem Erhitzen
HPLC:	R_t (System 4): 24.7 min R_t (System 12): 30.0 min
UV/VIS:	λ_{max} (HPLC) [nm]: 204, 256, 358
IR:	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3436 (s), 1682 (m), 1680 (m), 1211 (w), 1188 (w), 1138 (w)
1H -NMR:	(600 MHz, $[D_6]$ Aceton): δ_H [ppm] = 6.83 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.98 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.33 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 8.25 (d, J = 8.4 Hz, 2H)
^{13}C -NMR:	(150 MHz, $[D_6]$ Aceton): δ_C [ppm] = 77.1 (C_q), 112.2 (C_q), 116.4 (2 \times CH), 116.5 (2 \times CH), 122.1 (C_q), 128.8 (2 \times CH), 130.0 (C_q), 132.7 (2 \times CH), 158.7 (C_q), 160.1 (C_q), 163.4 (C_q), 197.4 (CO), 199.5 (CO)
EI-MS:	m/z (%): 296 $[M-O]^+$ (19), 268 $[M-CO_2]^+$ (100), 134 (22), 121 (19), 120 (36), 107 (35), 94 (33)

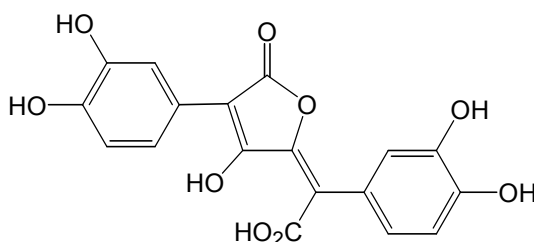
4.9 *Boletinellus rompelii* und *Boletinellus exiguus*

4.9.1 Isolierung

Von den getrockneten Pilzen werden Stücke von Stiel und Hut zerkleinert und mit folgenden Lösungsmitteln in der angegebenen Reihenfolge jeweils über Nacht extrahiert: Petrolether, Ethylacetat, Aceton, Methanol und Methanol mit Zusatz von Salzsäure.

Nach Abfiltrieren werden die Rohextrakte vom Lösungsmittel befreit, die Rückstände werden in Methanol gelöst und nach Filtration mittels analytischer HPLC untersucht. Da nur die Aceton- und Methanol-Extrakte farbige Verbindungen enthalten, werden nur diese an semipräparativer HPLC getrennt. Man erhält sowohl aus *Boletinellus rompelii* als auch aus *Boletinellus exiguus* Variegatsäure (**17**) als Hauptpigment und eine Nebenverbindung, die sich durch Coinjektion als identisch mit **beb3** erweist.

4.9.2 Variegatsäure (**17**) aus *Bol. rompellii* bzw. *Bol. exiguus*



Summenformel: $C_{18}H_{12}O_9$ (MG = 372.28)

DC: R_f (System 1): 0.23

blau mit Kaliumhexacyanoferrat

HPLC: R_t (System 4): 9.2 min

R_t (System 11): 24.8 min

UV/VIS: λ_{\max} (HPLC) [nm]: 213, 267, 394

$^1\text{H-NMR}$: (600 MHz, $[\text{D}_6]\text{Aceton}$) δ_{H} [ppm] = 6.68 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.77 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.78 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.82 (s, br, 1H), 7.73 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.89 (s, br, 1H)

(-)-ESI-MS: m/z (%): 371 $[\text{M-H}]^-$ (100), 327 $[\text{M-CO}_2\text{H}]^-$ (25)

4.10 *Calostoma cinnabarinum*

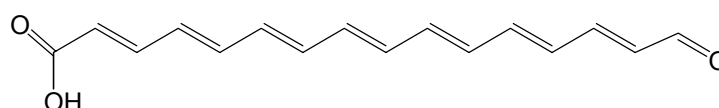
4.10.1 Aufarbeitung der Pilze

Die gesamte Aufarbeitung wird unter Lichtausschluß und unter Schutzgasatmosphäre durchgeführt, um eine Oxidation und Isomerisierung der Verbindung zu vermeiden.

Die luftgetrockneten Pilze werden von den Stielen getrennt (7.5 g) und etwas zerkleinert. Anschließend werden sie mehrmals mit je 800 ml Ethylacetat extrahiert, bis die Lösung farblos bleibt. Die vereinigten Rohextrakte werden bei Raumtemperatur auf ca. 600 ml eingengt und mehrmals gegen Wasser ausgeschüttelt. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat und Filtration wird das Lösungsmittel vollständig entfernt. Der Rückstand im Kolben wird mehrmals mit reinem Petrolether und mit Petrolether/Ethylacetat im Verhältnis 1:1 gewaschen. Man erhält 8.6 mg einer gelborangen, schwerlöslichen Substanz.

Die harten, noch immer orangerot gefärbten Pilzstücke werden in einer Reibschale mit gereinigtem, geglühtem Seesand verrieben und anschließend mit Methanol unter Argon und Lichtschutz erschöpfend extrahiert (jeweils 400 ml). Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum bei 20°C wird der Rückstand in Ethylacetat gelöst und wie oben beschrieben behandelt. Es können 5.8 mg der gereinigten Verbindung aus dem Methanolextrakt gewonnen werden.

4.10.2 Farbstoff 100



Ausbeute: 14.4 mg (0.19% der getrockneten Pilze)
orange-gelber Feststoff

Summenformel: $C_{16}H_{16}O_3$ (MG = 256.30)

Schmp.: nicht messbar, da Substanz nicht rein genug

DC: R_f (System 1): 0.37
blaugrün mit H_2SO_4 konz.

HPLC: R_t (System 4): 20.6 min

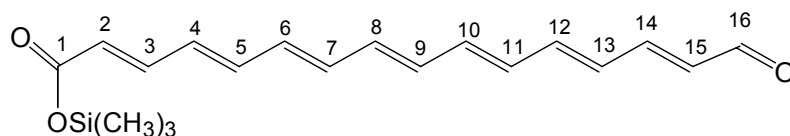
UV/VIS: λ_{max} (Methanol) (log ϵ) [nm]: 248 (5.77, sh), 290 (5.70), 304 (5.70), 416 (6.26), 437 (6.25)

IR:	(KBr): $\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3430 (s, br), 2923 (m), 2853 (m), 1800 (w), 1694 (w), 1665 (m), 1639 (m), 1620 (m), 1588 (m), 1540 (w), 1386 (w), 1146 (ss), 1112 (m), 1013 (m)
EI-MS	m/z (%): 256 [M] ⁺ (100), 250 (22), 227 [M-COH] ⁺ (10), 213 (48), 185 (22), 171 (18), 149 (25), 129 (35), 115 (21), 97 (19), 85 (24), 73 (87), 71 (27), 69 (25), 61 (18), 60 (56), 57 (57), 55 (33)

4.10.3 Silylierung

Man versetzt 5.30 mg des Farbstoffes mit drei Tropfen *N*-Methyl-*N*-trimethylsilyl-trifluoracetamid und lässt etwa 10 Minuten reagieren. Das überschüssige Reagenz wird im Stickstoffstrom verblasen. Man erhält 5.8 mg der silylierten Verbindung **99**, die unverzüglich spektroskopisch untersucht wird.

4.10.4 Silylierungsprodukt **99**



Ausbeute: 5.8 mg (87%)

Summenformel: C₁₉H₂₄O₃Si (MG = 328.39)

¹H-NMR: (600 MHz, CDCl₃): δ_H [ppm] = 5.87 (d, J = 15.3 Hz, H-2), 6.17 (dd, J = 8.0, 15.0 Hz, H-15), 6.39 (dd, J = 11.3, 14.2 Hz, H-4), 6.41- 6.48 (m, H-5, 6, 7, 8, 9 und 11^{*}), 6.49 (dd, J = 11.6, 14.7 Hz, H-13), 6.54 (dd, J = 10.1, 14.5 Hz, H-10), 6.61 (dd, J = 10.1, 14.2 Hz, H-5), 6.72 (dd, J = 10.4, 14.7 Hz, H-12), 7.14 (dd, J = 11.6, 15.0 Hz, H-14), 7.26 (H-3[°]), 9.57 (d, J = 8.0 Hz, H-16)

¹³C-NMR: (151 MHz, CDCl₃): δ_C [ppm] = 123.1 (C-2), 130.0 (C-10), 130.6 (C-13), 131.2 (C-15), 132.9 (C-4), 134.0, 134.6, 136.5, 138.3 (C-6, 7, 8 und 9^{*}), 135.9 (C-11), 140.3 (C-5), 142.3 (C-12), 144.7 (C-3), 151.4 (C-14), 173.3 (C-1), 193.4 (C-16)

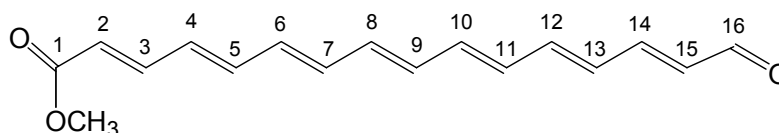
[°]: Unter Lösungsmittelsignal

^{*}: wegen Überlagerung der Signale keine genaue Zuordnung, bzw. Bestimmung der Kopplungskonstanten möglich

4.10.5 Methylierung von cc9

Vom Naturstoff **100** werden 5.0 mg in einem Spitzkölbchen unter Argon in 2 ml Methanol suspendiert und im Eisbad gerührt. Nun wird solange etherische Diazomethanlösung zugegeben, bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten ist (ca. 6 ml). Nach 30 minütigem Rühren bei 0° C ist der orange Niederschlag komplett in Lösung gegangen. Aus der gelben Flüssigkeit wird der Ether bei Raumtemperatur im Vakuum entfernt (Eisessig zur Entgiftung!), der Rückstand in Wasser suspendiert und mit Chloroform extrahiert. Die gelbe, organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Man erhält 4.1 mg des reinen Methylesters **101**.

4.10.6 Methylester **101**



Ausbeute: 4.1 mg (78 %)

Summenformel: C₁₇H₁₈O₃ (MG = 270.32)

DC: *R_f* (System 2): 0.8

blaugrün mit H₂SO₄ konz.

¹H-NMR: (600 MHz, CDCl₃): δ_H [ppm] = 3.68 (s, CH₃), 5.84 (d, *J* = 15.3 Hz, H-2), 6.10 (dd, *J* = 8.0, 15.0 Hz, H-15), 6.31 (dd, *J* = 11.3, 14.6* Hz, H-4), 6.34 (m, 1H, H-11), 6.35-6.40 (m, H-6-9), 6.42 (dd, *J* = 11.3, 15.0 Hz, H-13), 6.47 (dd, *J* = 11.3, 15.0 Hz, H-10), 6.55 (dd, *J* = 11.3, 14.6 Hz, H-5), 6.65 (dd, *J* = 11.3, 14.6 Hz, H-12), 7.07 (dd, *J* = 11.3, 15.0 Hz, H-14), 7.26 (dd, *J* = 11.3, 15.3 Hz, H-3), 9.51 (d, *J* = 8.0 Hz, H-16)

¹³C-NMR: (151 MHz, CDCl₃): δ_C [ppm] = 51.6 (CH₃), 120.9 (C-2), 130.7 (C-10), 131.1 (C-13), 131.3 (C-15), 133.0 (C-4), 133.9, 134.7, 136.7, 138.3 (C-6, 7, 8 und 9*), 135.8 (C-11), 140.4 (C-5), 142.3 (C-12), 144.3 (C-3), 151.4 (C-14), 167.4 (C-1), 193.3 (C-16)

*: Zuordnung bzw. Kopplungskonstanten wegen Überlagerung nicht genau zu bestimmen

EI-MS: *m/z* (%): 270 [M]⁺ (100), 211 [M-CO₂CH₃]⁺ (5), 209 [M-CHO, CH₃OH]⁺ (5), 181 (10), 169 (5), 167 (10), 166 (7), 165 (11), 153 (8), 141 (13), 129 (17), 128 (14), 117 (14), 116 (8), 115 (20), 105 (9), 91 (25)

HR-EI-MS gef.: 270.1257 ber.: 270.1256

4.11 *Clavulinopsis fusiformis*

4.11.1 Extraktion der deutschen und amerikanischen Kollektion

Da Verbindungen mit carotinoiden Strukturen licht- und oxidationsempfindlich sind und bei Belichtung zu Isomerisierung neigen, wird die gesamte Aufarbeitung unter Lichtausschluß und Argonatmosphäre durchgeführt.

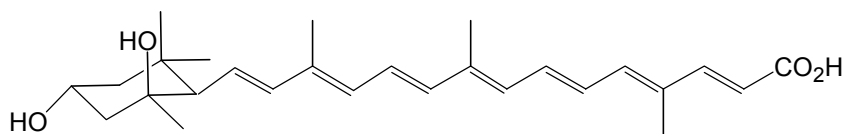
Extraktion der deutschen Spezies:

Die frisch eingefrorenen Pilzfruchtkörper (95 g) werden im Ganzen mit Petrolether 30 min entfettet und anschließend mit Ethylacetat bis zur Farblosigkeit extrahiert. Die gelben Extrakte werden bei 20° C im Vakuum etwas eingeeengt und gegen Wasser ausgeschüttelt. Nach Trocknung über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel entfernt, der gelbbraune Rohextrakt (0.178 g) wird in Methanol aufgenommen und durch Festphasenextraktion an RP 18 Material gereinigt. Die Trennung und Reinigung erfolgte anschließend durch präparative und analytische HPLC.

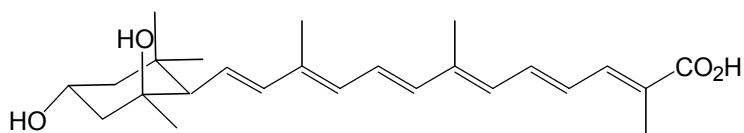
Extraktion der amerikanischen Pilze:

Von den amerikanischen Pilzen werden die neuesten Kollektionen aufgearbeitet, da bei älteren Exemplaren die Farbstoffe, vermutlich durch Lichteinwirkung, schon zerstört sind. Deren Fruchtkörper sind elfenbeinfarben bis beige, in den Extrakten sind keinerlei Gelbfarbstoffe nachzuweisen.

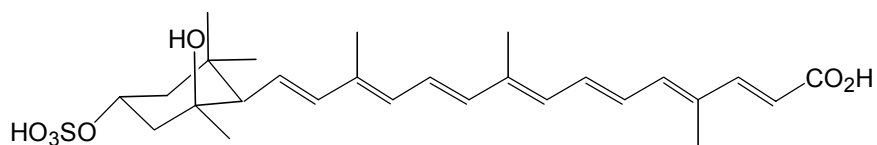
Die luftgetrockneten Vergleichsexemplare werden in etwas Wasser aufgequollen und mit Ethanol (90 %) erschöpfend extrahiert. Der gelbe ethanolische Extrakt wird vom Lösungsmittel befreit und gegen Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organischen Phasen werden bis zur Trockene eingeeengt, in Methanol aufgenommen und über RP 18-Kartusche filtriert. Der so bereitete Rohextrakt wird für analytische HPLC-Untersuchungen und Coinjektionen eingesetzt.

4.11.2 Fusiformin A (102)

Ausbeute:	6.2 mg (0.007 % der frischen Pilze) gelber Feststoff
Summenformel:	C ₂₇ H ₃₈ O ₄ (MG = 426.59)
DC:	<i>R_f</i> (System 1): 0.47 blaugrün mit H ₂ SO ₄ konz.
HPLC:	<i>R_t</i> (System 7): 45.2 min <i>R_t</i> (System 5): 44.4 min <i>R_t</i> (System 13): 68.5 min
UV/VIS:	λ_{max} (HPLC) [nm]: 243, 306, 421
EI-MS:	<i>m/z</i> (%): 426 [M] ⁺ (1), 412 (9), 379 (12), 337 (5), 280 (13), 262 (91), 234 (13)

4.11.3 Fusiformin B (103)

Ausbeute:	2.1 mg, im Gemisch mit (13Z)-Fusiformin B (107) gelber Feststoff
Summenformel:	C ₂₅ H ₃₆ O ₄ (MG = 400.55)
DC:	<i>R_f</i> (System 1): 0.47 blaugrün mit H ₂ SO ₄ konz.
HPLC:	<i>R_t</i> (System 7): 42.2 min <i>R_t</i> (System 5): 41.8 min <i>R_t</i> (System 13): 57.4 min
UV/VIS:	λ_{max} (HPLC) [nm]: 231, 285, 397

4.11.4 Fusiformin A-3-Sulfat (104)

Ausbeute: 6.60 mg (0.007 % der frischen Pilze)

gelber Feststoff

Summenformel: $C_{27}H_{38}O_7S$ (MG = 506.60)

DC: R_f (System 1): 0.46

blaugrün mit H_2SO_4 konz.

HPLC: R_t (System 7): 36.8 min

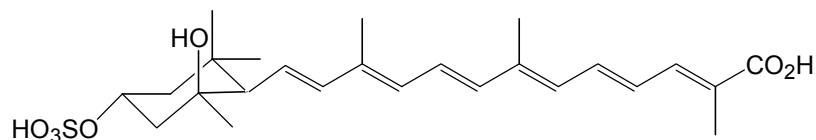
R_t (System 5): 26.1 min

R_t (System 13): 34.7 min

UV/VIS: λ_{max} (HPLC) [nm]: 244, 306, 421

(-)-ESI-MS: m/z (%): 505 $[M-H]^-$ (100)

(-)-ESI-MS-HR gef.: 505.2260 ber.: 505,2260

4.11.5 Fusiformin B-3-Sulfat (105)

Ausbeute: 0.30 mg (0.0003 % der frischen Pilze)

gelber Feststoff

Summenformel: $C_{25}H_{36}O_7S$ (MG = 480.56)

DC: R_f (System 1): 0.23

blaugrün mit H_2SO_4 konz.

HPLC: R_t (System 7): 34.5 min

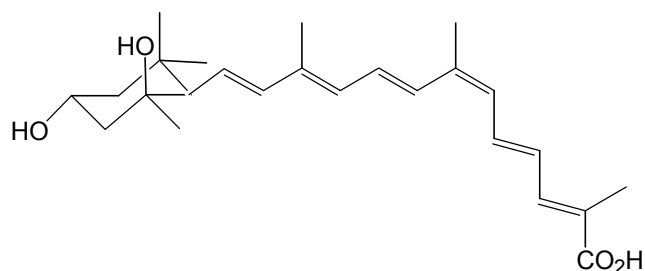
R_t (System 5): 24.2 min

R_t (System 13): 30.3 min

UV/VIS: λ_{max} (HPLC) [nm]: 231, 288, 394

(-)-ESI-MS: m/z (%): 479 $[M-H]^-$ (100)

4.11.6 (13Z)-Fusiformin B (107)



Ausbeute: 2.1 mg im Gemisch mit Fusiformin B (**103**)

Summenformel: $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_4$ (MG = 400.55)

DC: R_f (System 1): 0.47

blaugrün mit H_2SO_4

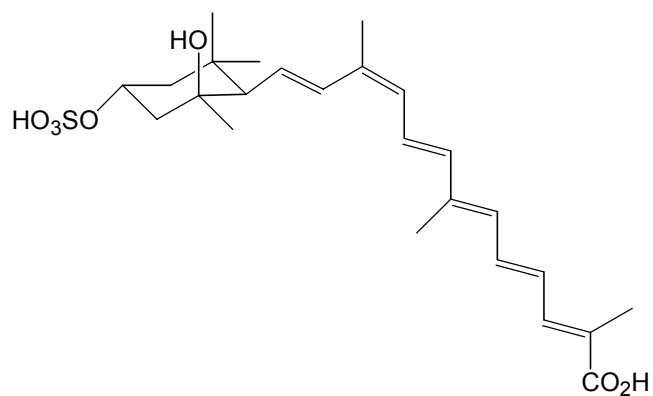
HPLC: R_t (System 7): 40.9 min

 R_t (System 5): 41.8 min

R_t (System 13): 57.4 min

UV/VIS: λ_{max} (HPLC) [nm]: 236, 289, 391

4.11.7 (9Z)-Fusiformin B-3-sulfat (106)



Summenformel: $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_7\text{S}$ (MG = 480.56)

DC: R_f (System 1): 0.36

blaugrün mit H_2SO_4

HPLC: R_t (System 7): 34.1 min

 R_t (System 5): 23.6 min R_t (System 13): 31.8 minUV/VIS: λ_{max} (HPLC) [nm]: 231, 288, 394

4.11.8 Z-Fusiformin A (109)

Summenformel:	$C_{27}H_{38}O_4$
DC:	R_f (System 1): 0.47 blaugrün mit H_2SO_4
HPLC:	R_t (System 7): 43.7 min R_t (System 5): 42.9 min
UV/VIS:	λ_{max} (HPLC) [nm]: 249, 307, 415

4.12 *Pycnoporellus fulgens*

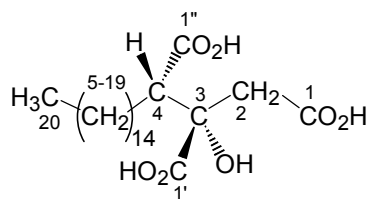
4.12.1 Isolierung von py1

Der gefrorene Pilz (9.5 g) wird grob zerkleinert und in einem Gemisch aus Aceton/Methanol im Verhältnis 1:1 mehrmals extrahiert. Der orangefarbene Rohextrakt wird mehreren Trennversuchen unterzogen.

Versuche, ein geeignetes Trennsystem zu entwickeln, schlagen fehl. Auf polaren Medien wie Kieselgel kommt es zu einem starken Tailing der Verbindungen, so daß kein Trenneffekt vorhanden ist. Polarere Laufmittel mit einem höheren Anteil an Säure führen zur Zersetzung der Substanzen. Auch an unpolaren Phasen ist keine Reinigung möglich, da sich die Verbindungen irreversibel an die stationäre Phase binden. Selbst mit Gelchromatographie an Sephadex[®] LH 20 und LH 60 kann keine Trennung erzielt werden. Es wird daher versucht, durch saures und basisches Ausschütteln einen Teil der Begleitsubstanzen zu entfernen.

Dazu wird das Lösungsmittel bei 40° C im Vakuum entfernt und der verbleibende braunrote Rückstand mit gesättigter NaHCO₃-Lösung versetzt. Dabei löst sich der braunorange Rückstand mit rötlicher Farbe. Zur Entfernung von unpolaren Verbindungen wird mehrfach mit Petrolether ausgeschüttelt. Anschließend wird mit verdünnter Salzsäure angesäuert und erschöpfend mit Ethylacetat extrahiert. Die Farbe der wässrigen Phase schlägt nach hellgelb um und die farbigen Bestandteile gehen vollständig in die organische Phase über. Aus den vereinigten Essigsäureethylesterphasen wird das Lösungsmittel entfernt und man erhält 3.1 g eines orange gefärbten Feststoffgemisches.

4.12.2 Agaricinsäure (110)



Ausbeute: 3.1 g orange-bräunliches Rohprodukt

Summenformel: C₂₂H₄₀O₇ (MG = 416.56)

UV/VIS: λ_{max} (Methanol, pH 7) [nm]: 219, 287, 317, 431

λ_{max} (Methanol, pH 12) [nm]: 210, 291, 525

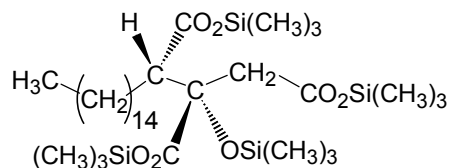
IR: (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3436 (s, br), 2922 (s), 2852 (m), 1718 (m), 1629 (w), 1464 (w), 1381 (w), 1194 (w), 1117 (w), 720 (w)

$^1\text{H-NMR}$:	(600 MHz, $[\text{D}_4]\text{Methanol}$): δ_{H} [ppm] = 0.92 (t, J = 7.7 Hz, 3H), 1.31 (s, 28H), 1.52 (m, 1H), 1.83 (dd, J = 10.4, 21.6 Hz, 1H), 2.68 (dd, J = 2.2, 21.6 Hz, 1H), 2.71 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 3.10 (d, J = 16.4 Hz, 1H)
$^{13}\text{C-NMR}$:	(150 MHz, $[\text{D}_4]\text{Methanol}$): δ_{C} [ppm] = 14.7 (C-20), 24.0 (C-19), 28.4 (C-5), 29.1 (C-6), 30.7, 30.8, 30.9, 31.0, 31.1 (C7-17), 33.4 (C-18), 42.7 (C-2), 55.1 (C-4), 77.1 (C-3), 174.2 (C-1), 176.5 (C-4'), 177.0 (C-3')
(–)-ESI-MS	m/z (%): 415 (100) $[\text{M-H}]^-$

4.12.3 Silylierung

Von dem vorgereinigten Extrakt werden 2 mg mit einigen Tropfen MSTFA versetzt und 2 Stunden bei 40° C inkubiert. Von der Probe wird ein (–)-EI-MS aufgenommen.

4.12.4 Silylierungsprodukt 111



Summenformel: $\text{C}_{34}\text{H}_{72}\text{O}_7\text{Si}_4$ (MG = 704.95)

(–)-EI-MS: m/z (%): 689 $[\text{M-CH}_3]^-$ (8), 662 (18), 661 (32), 571 (13), 560 (12), 559 (27), 543 (18), 497 (22), 471 (16), 470 (35), 469 (100), 217 (12), 147 (56) 75 (25), 73 (63)

5 Anhang

5.1 Verzeichnis der Pilzkollektionen

Porphyrellus pseudoscaber wurde in den Jahren 2000 und 2001 im Forstenrieder Park, München, gesammelt (leg. et det. Gruber).

Xanthoconium affine wurde im Rahmen von Pilzexkursionen in die USA in den Jahren 1997, 1998 und 1999 gesammelt (leg. et det. Arnold, Helfer).

Von folgenden Kollektionen wurden die Huthäute aufgearbeitet:

231/97	Flint's Pond, Lincoln/Maynard, Massachusetts
20/98	Eastabrook Woods, Concord/Maynard, Massachusetts
52/98	Flint's Pond, Lincoln/Maynard, Massachusetts
110/98	Flint's Pond, Lincoln/Maynard, Massachusetts
142/98	Eastabrook Woods, Concord/Maynard, Massachusetts
55/99	White Mountains National Park, New Hampshire
95/99	White Mountains National Park, Burnt Mill Brook, New Hampshire
127/99	White Mountains National Park, Langdon Brook, New Hampshire

Boletus erythropus wurde in den Jahren 2000 und 2001 im Franzburger Forst, Mecklenburg-Vorpommern, gesammelt (leg. et det. Schultz). Extrahiert wurde die vom frischen Pilz abgezogene, getrocknete Huthaut.

Leccinum chromapes wurde ebenfalls in USA gesammelt, von zwei Kollektionen aus dem Jahre 1999 (leg. et det. Arnold) wurden nur die Huthaut und die Hüte verwendet.

108/99	White Mountains National Park, Burnt Mill Brook, New Hampshire
94/99	White Mountains National Park, Burnt Mill Brook, New Hampshire

Boletus griseus wurde im Jahr 1998 im Rahmen einer Pilzkollektion in die USA gesammelt (leg. et det. Arnold). Folgende Kollektionen standen zur Verfügung:

162/98	Lincoln Town Forrest, Lincoln/Maynard, Massachusetts
12/98	Breakhart Reservation, Saugus/Wakefield, Massachusetts

Boletus retipes/ornatipes wurde in den Jahren 1999 im Osten der USA gesammelt (leg. et det. Arnold). Es wurden 2 Kollektionen extrahiert.

- 21/99 White Mountains National Park, entlang Rt. 112, New Hampshire
- 115/99 White Mountains National Park, entlang Rt. 112, New Hampshire

Boletus longicurvipes wurde im Osten der USA im Jahre 1998 gesammelt (leg. et det. Arnold, Steglich). Von den Kollektionen wurden alle Pilzfüße aufgearbeitet.

- 5/98 Eastabrook Woods, Concord/Maynard, Massachusetts
- 31/98 Eastabrook Woods, Concord/Maynard, Massachusetts
- 42/98 Flint's Pond, Lincoln/Maynard, Massachusetts
- 58/98 Flint's Pond, Lincoln/Maynard, Massachusetts
- 71/98 Blue Hills Reservation, Massachusetts
- 113/98 Flint's Pond, Lincoln/Maynard, Massachusetts
- 133/98 Eastabrook Woods, Concord/Maynard, Massachusetts II
- 134/98 Eastabrook Woods, Concord/Maynard, Massachusetts I
- 158/98 Lincoln Town Forrest, Lincoln/Maynard, Massachusetts

Boletinellus rompelii und ***Boletinellus exiguus*** wurden 2000 von A. de Meijer in Sao José des Pinhais, Paraná, Brasilien gesammelt (leg. et det. A. de Meijer).

Calostoma cinnabarinum wurde im Rahmen einer Pilzexkursion in den Osten der USA im Jahre 1996 gesammelt (leg. et det. N. Arnold).

- 141/96 Coweeta Hydrologic Lab, Rt. 83, Otto, North Carolina
- 156/96 Coweeta Hydrologic Lab, Rt. 83, Otto, North Carolina

Clavulinopsis fusiformis wurde 1999 in Garmisch-Patenkirchen (Kochelberg) gesammelt (leg. et det. Steglich). Die Vergleichskollektion aus USA wurde im Jahre 1999 im White Mountains National Park gesammelt (leg. et det. Arnold).

Pycnoporellus fulgens wurde im Jahr 2000 von W. Steglich am Whitewater River, Dallas Trail, USA, gesammelt (leg. et det. Steglich).

5.2 Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetyl
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
<i>B.</i>	<i>Boletus</i>
ber.	berechnet
<i>Bol.</i>	<i>Boletinus</i>
<i>C.</i>	<i>Calostoma</i>
CD	Circulardichroismus
CI	Chemische Ionisation
COSY	Correlated Spectroscopy
DC	Dünnschichtchromatographie
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMAP	4-(<i>N,N</i> -Dimethylamino)pyridin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EE	Ethylacetat
EI	Elektronenstoßionisation
ESI	Elektronensprayionisation
Fa.	Firma
FAB	Fast Atom Bombardement
GC	Gaschromatographie
gef.	gefunden
HMBC	Hetero Multiple Bond Coherence
HMQC	Hetero Multiple Quantum Coherence
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
HR-MS	High Resolution Mass Spectroscopy
IR	Infrarotspektroskopie
konz.	konzentriert
<i>L.</i>	<i>Leccinum</i>
<i>M.</i>	<i>Melanogaster</i>
M	Molekölion
Me	Methyl
min	Minuten
MS	Massenspektrometrie

MSTFA	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -trimethylsilyl-trifluoracetamid
<i>m/z</i>	Masse-Ladungsverhältnis
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NOE	Nuclear-Overhauser-Enhancement
NOESY	Homonucleares zweidimensionales Kern-Overhauser-Experiment
PE	Petrolether (Siedebereich 40-60° C)
<i>P.</i>	<i>Porphyrellus</i>
<i>Pyc.</i>	<i>Pycnoporellus</i>
<i>R_f</i>	Retentionsfaktor (DC)
<i>R_t</i>	Retentionszeit (HPLC)
RP	Reverse Phase
Schmp.	Schmelzpunkt
Tfa	Trifluoressigsäure
TMS	Trimethylsilyl
<i>T.</i>	<i>Tylopilus</i>
UV/VIS	Ultraviolett/Visible
<i>X.</i>	<i>Xanthoconium</i>
Zers.	Zersetzung

6 Literaturverzeichnis

- [1] G. Ainsworth, *Introduction to the history of Mycology*, Cambridge University Press, London, New York, Melbourne, **1976**.
- [2] <http://www.dgfm-ev.de/www/de/projekte/pdj1995.php3>.
- [3] Vorlesungsskript *Spezielle Lebensmittelchemie*, Prof. Severin, **1996/1997**.
- [4] G. Eisenbrand, P. Schreier, *Römpp Lexikon Lebensmittelchemie*, Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1995**.
- [5] W. Steglich, B. Fugmann, S. Lang-Fugmann, *Römpp Lexikon Naturstoffe*, Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1997**.
- [6] B. Wolters, *Deutsche Apotheker Zeitung* **1985**, 125, 643-647.
- [7] J. von Arx, *Pilzkunde*, Cramer Verlag, Lehre, **1967**.
- [8] M. Knoop, *Pilze Bestimmen, Sammeln, Zubereiten*, Falken Verlag, Niederhausen Traunstein, **1997**.
- [9] http://www.biologie.uni-hamburg.de/b_online/e01/01f.htm.
- [10] A. Bresinsky, *Z. Mykol.* **1996**, 62, 147-168.
- [11] F. Jacob, A. Jäger, E. Ohmann, *Botanik, 4. Auflage*, UTB Gustav Fischer Verlag, Jena, **1994**.
- [12] M. Flück, *Welcher Pilz ist das? Erkennen, sammeln, verwenden*, Franckh-Kosmos-Verlag, Stuttgart, **1995**.
- [13] K. Hoiland, *Nord. J. Bot.* **1987**, 7, 705-718.
- [14] H. Besl, A. Bresinsky, *Pl. Syst. Evol.* **1997**, 206, 223-242.
- [15] R. Singer, *The Agaricales in Modern Taxonomy, 4. Edit.*, Koeltz Scientific Books, Koenigstein, **1986**.
- [16] M. Gill, W. Steglich, *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, 51*, Springer Verlag Wien, New York, **1987**.
- [17] H. Besl, I. Michler, R. Preuß, W. Steglich, *Z. Naturforsch.* **1974**, 29 c, 784-786.
- [18] A. Bresinsky, H. Besl, *Z. Mykol.* **1978**, 45, 247-264.
- [19] C. Kilpert, *Untersuchungen zur Biosynthese und Struktur von Pilzfarbstoffen*, Diplomarbeit, Universität Bonn, **1982**.
- [20] H. Schmidt, *Vergleichende Untersuchungen über das Vorkommen von Farbstoffen in Höheren Pilzen der Ordnungen Boletales und Gastromycetes*, Dissertation, Universität Bonn, **1990**.

- [21] H. Besl, A. Bresinsky, L. Kopanski und W. Steglich, *Z. Naturforsch.* **1978**, 33 c, 820-825.
- [22] H. Besl, A. Bresinsky, G. Geigenmüller, R. Herrmann, C. Kilpert, W. Steglich, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 803-810.
- [23] M. Holzapfel, C. Kilpert, W. Steglich, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, 797-801.
- [24] C. Stahlschmidt, *Liebigs Ann. Chem.* **1877**, 187, 177-197.
- [25] H. Besl, A. Bresinsky, I. Kronawitter, *Z. Pilzkd.* **1975**, 41, 81-98.
- [26] W. Steglich, I. Pils, A. Bresinsky, *Z. Naturforsch.* **1971**, 26 b, 376-377.
- [27] N. Arnold, W. Steglich, H. Besl, *Z. Mykol.* **1996**, 62, 69-73.
- [28] J. Santesson, *Phytochemistry* **1967**, 6, 685-686.
- [29] A. Spiegel, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1882**, 15, 1546-1554.
- [30] R. Marumoto, C. Kilpert, W. Steglich, *Z. Naturforsch.* **1986**, 41c, 363-365.
- [31] W. Steglich, *Chem. unserer Zeit* **1975**, 9, 117-123.
- [32] M. Gill, *Nat. Prod. Rep.* **1994**, 11, 67-90.
- [33] W. Steglich, W. Furtner, A. Prox, *Z. Naturforsch.* **1968**, 23 b, 1044-1050.
- [34] L. Kahner, *Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus Pilzen der Ordnung Boletales und vergleichende HPLC-Untersuchungen*, Dissertation, Universität München, **2001**.
- [35] C. Kilpert, *Konstitutionsaufklärung von Pilzfarbstoffen und deren Analyse mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie*, Dissertation, Universität Bonn, **1986**.
- [36] W. Marschner, *Totalsynthese von Badion A, einem Pigment des Maronenröhrlings (Xerocomus badius) und verwandten Pulvinsäuren*, Dissertation, Bonn, **1992**.
- [37] R. Edwards, M. Gill, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1973**, 1921-1929.
- [38] B. Steffan, *Untersuchung über Pilz- und Flechtenfarbstoffe, insbesondere die Hutfarbstoffe des Maronenröhrlings (Xerocomus badius)*, Dissertation, Universität Bonn, **1981**.
- [39] B. Steffan, W. Steglich, *Angew. Chem.* **1984**, 96, 435-437.
- [40] W. Steglich, H. Huppertz, B. Steffan, *Angew. Chem.* **1985**, 97, 716-717.
- [41] M. Gill, *Phytochemistry* **1985**, 24, 1351-1354.
- [42] M. Gill, M. Kiefel, *Aust. J. Chem.* **1994**, 47, 1967-1977.
- [43] M. Winner, Universität München, Dissertation in Vorbereitung.
- [44] H. Besl, A. Bresinsky, W. Steglich, K. Zipfel, *Chem. Ber.* **1973**, 106, 3223-3229.
- [45] R. Feling, *Konfiguration, Synthese und Biosynthese von 2,5-Diarylcyclopentenonen aus Pilzen der Ordnung Boletales*, Dissertation, Universität München, **2000**.

- [46] W. Steglich, A. Thilmann, H. Besl, A. Bresinsky, *Z. Naturforsch.* **1977**, 32 c, 46-48.
- [47] R. Edwards, G. Elsworth, N. Kale, *J. Chem. Soc. (C)* **1976**, 405-409.
- [48] A. Bresinsky, H. Besl, W. Steglich, *Phytochemistry* **1974**, 13, 271-272.
- [49] K. Aulinger, *Biosynthese, Synthese und Strukturaufklärung von Pilzinhaltsstoffen aus *Lyophyllum connatum*, *Melanogaster broomeianus*, *Macrolepiota rhacodes* und *Lepiota americana**, GCA-Verlag, Herdecke, **1999**.
- [50] L. Stryer, *Biochemie*, 4. Aufl., Akad. Verlag, New York, **1996**.
- [51] P. Nuhn, *Naturstoffchemie*, 3. Aufl., S. Hirzel Verlag, Stuttgart, **1997**.
- [52] R. Herrmann, *Untersuchungen zur Konstitution, Synthese und Biosynthese von Pilzfarbstoffen*, Dissertation, Universität Bonn, **1980**.
- [53] S. Lang-Fugmann, *Untersuchungen zur Synthese und Biosynthese prenylierter Chinone in Höheren Pilzen*, Dissertation, Universität Bonn, **1987**.
- [54] P. Beaumont, R. Edwards, *J. Chem. Soc. (C)* **1969**, 2398-2403.
- [55] H. Besl, H. Hecht, P. Luger, V. Pasupathy, W. Steglich, *Chem. Ber.* **1975**, 108, 3675-3691.
- [56] M. Gill, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, 16, 301-319.
- [57] M. Lang, *Rhizopogon, ein Ansachinon aus dem Wurzeltrüffel *Rhizopogon pumilionis**, Diplomarbeit, Universität München, **1997**.
- [58] J. Dasenbrock, *Isolierung und Strukturaufklärung neuer Wirkstoffe aus Höheren Pilzen*, Dissertation, Universität Bonn, **1994**.
- [59] V. Hellwig, *Isolierung, Strukturaufklärung und chemotaxonomische Untersuchung von Sekundärmetaboliten aus Pilzen*, Dissertation, Universität München, **1998**.
- [60] V. Hellwig, J. Dasenbrock, C. Gräf, L. Kahner, S. Schumann, W. Steglich, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 2895-2904.
- [61] K. Justus, *Untersuchungen über die Inhaltsstoffe des nordamerikanischen Röhrlings *Boletus retipes**, Dissertation, Universität Bonn, **1993**.
- [62] O. Sterner, B. Steffan, W. Steglich, *Tetrahedron* **1987**, 43, 1075-1082.
- [63] P. Spiteller, *Biosynthese und Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus Pilzen, Pflanzen und Flechten*, Dissertation, Universität München, **2001**.
- [64] [http://www.mycobase.com/Mycoweb.acgi\\$showlargespezies?genus=porphyrellus&nummer=1](http://www.mycobase.com/Mycoweb.acgi$showlargespezies?genus=porphyrellus&nummer=1).
- [65] G. Krieglsteiner, *Die Großpilze Baden-Württembergs*, Bd. 2, Ulmer Verlag, Stuttgart, **2000**.
- [66] R. Dähncke, *1200 Pilze in Farbfotos*, Weltbildverlag, **2001**.

- [67] G. Kriegelsteiner, N. Gerold, *Z. Mykol.* **1986**, 52, 47-60.
- [68] G. Kriegelsteiner, *Südwestdt. Pilzrundschau* **1984**, 20, 1-8.
- [69] W. Steglich, F. Esser, *Phytochemistry* **1973**, 12, 1817.
- [70] C. Wolfe, jr., *Austroboletus and Tylopilus subgenus Porphyrellus with emphasis of the North American taxa*, J. Cramer Verlag, Vaduz, **1979**.
- [71] W. Steglich, B. Steffan, G. Clooth, D. Aumann, *Angew. Chem.* **1989**, 101, 495-496.
- [72] R. Singer, *The Boletineae of Florida*, J. Cramer Verlag, Vaduz, **1977**.
- [73] R. Singer, *The Agaricales in Modern Taxonomy*, 4. Edit., Koeltz Scientific Books, Koenigstein, **1986**.
- [74] M. Binder, *Zur molekularen Systematik der Boletales: Boletineae und Sclerodermatineae subordo nov.*, Dissertation, Universität Regensburg, **1999**.
- [75] Yama-Kei, *Field Books*, Yama-Kei Publishers Co., Tokyo, **1994**.
- [76] A. Smith, H. Thiers, *The Boletes of Michigan*, University of Michigan Press, **1971**.
- [77] W. Snell, E. Dick, *The Boleti of Northeastern North America*, J. Cramer Verlag, Lehre, **1970**.
- [78] www.in2.dk.
- [79] D. Klostermeyer, L. Knops, T. Sindlinger, K. Polborn, W. Steglich, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 603-609.
- [80] A. Bessette, A. Bessette, D. Fischer, *Mushrooms of Northeastern North America*, Syracuse University Press, **1997**.
- [81] W. Steglich, H. Besl, K. Zipfel, *Z. Naturforsch.* **1974**, 29 b, 96-98.
- [82] E. Merck, *Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie*, Darmstadt, **1984**.
- [83] J. Hueso-Rodriguez, B. Rodriguez, *Tetrahedron* **1989**, 45, 1567-1576.
- [84] E. Monflier, S. Pellegrini, A. Mortreux, F. Petit, *Tetrahedron Letters* **1991**, 32, 4703-4704.
- [85] E. Fields, S. Behrend, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 5165-5170.
- [86] H. Schmauder, D. Gröger, H. Grüner, D. Lohmann, *Pharmazie* **1988**, 43, 313-314.
- [87] T. Hamasaki, H. Nakajima, T. Yokota, Y. Kimura, *Agric. Biol. Chem.* **1983**, 47, 891-892.
- [88] G. Barron, *Mushrooms of Northeast North America*, Lone Pine Publishing, Canada, **1999**.
- [89] M. Binder, A. Bresinsky, *Feddes Repertorium* **2002**, 113, 30-40.
- [90] D. Gedge, G. Pattenden, A. Smith, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1986**, 2127-2131.

- [91] G. Pattenden, N. Pegg, A. Smith, *Tetrahedron* **1986**, 27, 403-406.
- [92] <http://biol.vt.edu/departement/faculty/miller/appfung/bolorna.htm>.
- [93] J. Klamann, *Neue Inhaltsstoffe aus höheren Pilzen (Makromyceten)*, Dissertation, Universität Bonn, **1988**.
- [94] A. Ingerl, *Totalsynthese des Pilzinhaltsstoffes Retipolid E*, Dissertation, Universität München, **1995**.
- [95] F. Mohamedi, N. Richards, W. Guida, R. Liskamp, M. Lipton, C. Canfield, G. Chang, T. Hendrickson, W. Still, *J. Comput. Chem.* **1990**, 11, 440-467.
Kraftfeldberechnungen wurden mit *MacroModel 5.5* (Merck Molecular Force Field) durchgeführt. Die Visualisierung der berechneten Konformationen erfolgte mit dem *WebLabViewer 2.01* (Molecular Simulations Inc.).
- [96] H. Shibata, T. Fukuda, T. Wada, Y. Morita, T. Hashimoto, Y. Asakawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1998**, 62, 1432-1434.
- [97] R. Watling, M. De, *Edinburgh Journal of Botany* **1997**, 54, 231-251.
- [98] M. Binder, A. Bresinsky, *Mykologia* **2002**, 94, 85-98.
- [99] M. Jarosch, *Zur molekularen Systematik der Boletales: Coniophorineae, Paxillineae und Suillineae*, Bibliotheca Mykologica, 191, J. Cramer Verlag, Berlin, Stuttgart, **2001**.
- [100] D. Arora, *Mushrooms Demystified*, 2. Auflage, Ten Speed Press, Berkley, California, **1986**.
- [101] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 5. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1995**.
- [102] H. Erdtman, *Acta Chem. Scand.* **1948**, 2, 209-219.
- [103] U. Mocek, *Neue Wirkstoffe aus Basidiomyceten*, Dissertation, Universität Bonn, **1985**.
- [104] A. Andrewes, *Acta Chem. Scand.* **1973**, 27, 2574-2580.
- [105] H. Laux, *Der große Kosmos Pilzführer*, Franckh-Kosmos Verlag, Stuttgart, **2001**.
- [106] H. Besl, A. Bresinsky, *Z. Pilzk.* **1977**, 43, 311-322.
- [107] L. Knops, *Inhaltsstoffe aus Pilzen der Gattung Tricholoma und aus Pseudomerulius curtisii*, Dissertation, Universität Bonn, **1992**.
- [108] J. Fiasson, R. Petersen, M. Bouchez, N. Arpin, *Rev. Mycologie* **1969**, 34, 357-364.
- [109] A. Dorn, *Untersuchungen über die Farbstoffe der Spindelförmigen Keule (Clavulinopsis fusiformis) und andere Pilze*, Dissertation, München, **1996**.
- [110] <http://www.sll.fi/11/Ilvi/sienet/Pfulg.html>.

-
- [111] G. Kriegelsteiner, *Die Großpilze Baden-Württembergs, Bd. 1*, Ulmer Verlag, Stuttgart, **2000**.
- [112] H. Thoms, J. Vogelsang, *Liebigs Ann. Chem.* **1907**, 357, 145-170.
- [113] S. Brandänge, S. Josephson, L. Mörch, S. Vallén, *Acta Chem. Scand.* **1977**, 31, 307-312.
- [114] <http://www.ambresadola.it/Micologia/storiaMic.htm>.
- [115] H. Braun, D. Frohne, *Heilpflanzenlexikon für Ärzte und Apotheker, 5. Aufl.*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, **1987**.
- [116] R. Carrano, M. Malone, *J. Pharm. Sciences* **1967**, 56, 1611-1614.
- [117] R. Freedland, R. Newton, *Methods in Enzymology (D)* **1981**, 72, 497-504.
- [118] P. Matthioli, *Senensis commentarii de Medica Materia, Lib. Tertium*, **1560**.
- [119] J. Miyata, V. Tyler, L. Brady, *Lloydia* **1966**, 29, 43-49.
- [120] S. Gatenbeck, A. Måhlén, *Acta Chem. Scand.* **1968**, 22, 2613-2616.

Lebenslauf

Name: Gertraud Gruber, geb. Stusche
Geburtstag, Geburtsort: 29.04.1972 in München
Familienstand: verheiratet seit dem 29.01.1996
mit Jürgen Gruber, Diplom Berufspädagoge
Eltern: Gerhard und Gertraud Stusche, geb. Fischer

Schul Ausbildung:

Sept. 1978 - Juli 1982 Volksschule Seefeld-Hechendorf
Sept. 1982 - Juli 1991 Elsa-Brändström-Gymnasium, München
Sept. 1991 - März 1994 Berufsschule für Milchwirtschaftl. Laboranten, Triesdorf

Berufsausbildung:

Sept. 1991 - März 1994 Ausbildung zur Milchwirtschaftlichen Laborantin
Nordmolkerei Deller, München

Studium:

April 1994 - Juni 1998 Studium der Lebensmittelchemie an der LMU München
Abschluß: Erstes Staatsexamen

Tätigkeiten:

März - April 1994 Nordmolkerei Deller, München
Juli – Okt. 1997 Studentische Hilfskraft am Institut für Genetik und Mikrobiologie
der Universität München: Molekularbiologische Arbeiten an
Arabidopsis, Anzucht und Pflege der Pflanzen
Sept. 1998 - Jan. 2003 Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Organische
Chemie der Universität München: Betreuung des organisch-
chemischen Grundpraktikums für Chemiker und des chemischen
Praktikums für Mediziner mit Seminar

Promotion:

Sept. 1998 – Feb. 2002 Experimentelle Arbeiten zur Dissertation am Institut für
Organische der Universität München im Arbeitskreis Prof. Dr.
Steglich, Thema: *Isolierung und Strukturaufklärung*
chemotaxonomisch relevanter Sekundärmetabolite aus höheren
Pilzen, insbesondere aus der Ordnung der Boletales